Aus dem agrikulturchemischen und bakteriologischen Institut
der Universität Breslau.

Die Beziehung einiger aromatischer Verbindungen zur Benzoesäure- bezw. Hippursäurebildung und eine neue Methode zur Bestimmung von Salizylsäure neben Benzoesäure bezw. Hippursäure.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
hohen philosophischen Fakultät
der
Königlichen Universität zu Breslau
eingereicht
und mit Genehmigung derselben veröffentlicht
von

J. A. Bruno Schulz.

ACAD. LAND.BAU BRSL

Montag, den 18. September 1905, vormittags 11½ Uhr
in der Aula Leopoldina.

Vortrag:
Über Benetzungswärme und Hygroskopizität in bezug auf andere physikalische Bodeneigenschaften
und
Promotion.

Merseburg.
Druck von Friedrich Stollberg.
1905.

Sonder-Abdruck aus:

Mitteilungen der Landwirtschaftlichen Institute der
Königl. Universität Breslau
Bd. III, Heft 4.

Gedruckt mit Genehmigung der philosophischen Fakultät der
Königl. Universität Breslau.

Referent: Professor Dr. Th. Pfeiffer.

Dem Andenken meines teuren Vaters;

Meiner lieben Mutter.

Vorliegende Arbeit wurde im Sommersemester 1904 und Wintersemester 1904/05 im agrikulturchemischen und bakteriologischen Institut der Universität Breslau ausgeführt.

Es sei mir gestattet, ein Wort des Dankes an alle, die mich bei Anfertigung der Arbeit und bei meinem Studium unterstützt haben.

Vor allem fühle ich mich zu Dank verpflichtet meinem hochverehrten Lehrer Herrn Professor Dr. Theodor Pfeiffer.

Einstimmig haben alle seine Schüler die hervorragende Unterstützung betont, die sie von ihm erhielten, und wenn sie einem besonders zuteil wurde — so wurde sie mir, der ich mich ohne praktische Erfahrung dem Studium der Agrikulturchemie und damit auch der Landwirtschaft zuwandte. Wie als Führer durch die Doktorarbeit, so hat er auch insbesondere als Lehrer mir stets das wärmste Interesse entgegengebracht und dadurch wesentlich zum Fortgang meines Studiums beigetragen.

Zu danken habe ich weiterhin allen Herren, allen Freunden und Bekannten, die mich gelegentlich in liebenswürdiger Weise unterstützten und förderten, insbesondere: Dr. R. Riecke, Dr. A. Rümpler, Dr. P. Ehrenberg, Sanitätsrat Dr. R. Croce, Dr. Baumann etc. etc.

Sie alle haben zum Zustandekommen meines vorliegenden Werkes beigetragen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548202_0131

Lebenslauf.

Ich, Josephus Augustinus Bruno Schulz, katholischer Konfession, bin am 9. Juli 1880 geboren zu Skaibotten, Kreis Allenstein, Ostpreussen, als Sohn des 1885 gestorbenen Kölmers August Schulz und seiner Ehefrau Barbara geb. Gallandt. Von Ostern 1891 ab besuchte ich das Gymnasium zu Rössel, Ostpreussen, das ich Ostern 1901 mit dem Zeugnis der Reife verliess, um zunächst ein Semester in Würzburg und sodann in Breslau Chemie zu studieren. Nachdem ich am 28. April 1903 mein Verbandsexamen bestanden, arbeitete ich zwei Semester organisch und wandte mich dann dem Studium der Landwirtschaft, insbesondere der Agrikultur-Chemie zu. Am 27. und 28. Juni dieses Jahres bestand ich das Examen rigorosum. Seit dem 10. Juli 1905 bin ich bei Herrn Zivilingenieur R. Mestel, Breslau angestellt.

Während meines Studiums besuchte ich die Vorlesungen und Übungen folgender Herren Professoren und Dozenten: Abegg, Aereboe, Baumgartner, Brefeld, Ebbinghaus, Frech, Hantsch, Herz, Hintze, Holdefleiss, Kraus, Kükenthal, Ladenburg, O. E. Meyer, Th. Pfeiffer, von Rümker, Scholz, Triebs, Volz, Wien.

Allen diesen Herren werde ich stets ein dankbares Andenken bewahren.

Henneberg hatte nachgewiesen, dass nur der verdauliche, der im Organismus um- und angesetzte Anteil des Futters für den Wert desselben in Frage kommt und damit auch der Heuwertstheorie Thaers den Todesstoss versetzt; eine wichtige Ergänzung fand diese Lehre Hennebergs durch die Forschungen auf dem Gebiete des Energieumsatzes, wo Rubner bahnbrechend wirkte. Seine Versuche am Fleischfresser rechtfertigten den Schluss, dass die einzelnen Nährstoffe sich isodynam[1]) vertreten, d. h. dass sie in solchen Rationen, welche den Hungerbedarf nicht überschreiten, nach Massgabe derjenigen Wärmemengen ersetzt werden können, die aus ihnen beim Zerfall im Organismus frei werden. Jedoch schien dieses Gesetz eine Ausnahme zu machen, als Rubner einem Hunde, der im Zustand der physikalischen Wärmeregulation[2]) in 24 Stunden und pro Kilogramm Körpergewicht 55,4 Kal. an die Umgebung abgab, in Form von Fleisch, Leim, Fett oder Rohrzucker eine solche Ration verabreichte, dass der Nutzwert der Zufuhr ebenfalls 55,4 Kal. gleichkam. Hierbei zeigte es sich, dass jetzt der Zerfall von Körpersubstanz nur zum Teil aufgehoben und durch die Nahrung eine vermehrte Kohlensäureausscheidung und eine grössere Wärmeproduktion hervorgerufen wurde. Rubner bezeichnet diese Tatsache als „spezifische Wärmemehrung“ [3]) der einzelnen Nährstoffgruppen; O. Kellner[4]) ging einen Schritt weiter und unterschied zwei Arten der kinetischen Energie, die thermische und die dynamische. Erstere ist nur zur Wärmeproduktion bestimmt und ein Überschuss derselben über das zur Erhaltung der normalen Körpertemperatur notwendige Maß ist völlig wertlos; letztere dagegen ist dazu bestimmt, Kraft zu liefern, die Lebenstätigkeit der Zellen zu erhalten und Körpersubstanz zu bilden; ausnahmsweise jedoch wird auch sie bei Mangel der ersteren zur Wärmeproduktion herangezogen. Bei allen diesen Betrachtungen muss aber stets berücksichtigt werden, dass nicht die gesamte Menge der aus dem verdauten Futter zu erwartenden Energie als solche voll und ganz zur Wirkung kommt, vielmehr verlässt

[1]) Zeitschrift für Biologie Bd. 19, S. 313 und Bd. 22, S. 40.

[2]) D. h. bei einer Temperatur, bei der sich der Stoffwechsel lediglich nur noch auf die Deckung von dynamischer Energie (s. w. u.) beschränkt, während die erzeugte Wärme physiologisch wirkungslos bleibt.

[3]) Gesetze des Energieverbrauchs, 1902, S. 315 und 327.

[4]) O. Kellner, Die Ernährung der landwirtschaftlichen Nutztiere. Berlin 1905, S. 103 ff.

ein Teil hiervon unverwertet den Organismus in gasförmigen Produkten (Methan, Wasserstoff), im Kot (Verdauungssäfte) und im Harn (Harnstoff, Ammoniak, Harnsäure, Kreatinin, Xanthinkörper, Ätherschwefelsäure, Hippursäure etc.). Alle diese Ausscheidungen sind unvollständig oxydierte Körper, d. h. sie liefern bei der Verbrennung Wärme[1]) und bedeuten daher vom Standpunkte des Energiehaushalts im Organismus einen unvermeidlichen Verlust. Die durch diesen Ausfall verlorene Energie muss daher von der aus der verdauten Nahrung zur Verfügung stehenden Gesamtmenge abgezogen werden, wenn man den eigentlichen Nutzwert oder die nutzbare Energie, „den physiologischen Nutzeffekt" eines Futtermittels kennen lernen will. Diese in oben dargelegter Weise eintretenden Verluste sind im Harn am grössten und es werden hierbei unter anderm die aus dem Eiweiss der Nahrung stammenden nicht verwertbaren Stickstoffverbindungen abgeschieden. Je nach der Form, in welcher die letztern auftreten, ist auch die in ihnen enthaltene Energie eine verschiedene. So erzeugt z. B. ein Rind von 600 kg Körpergewicht, das im Erhaltungsfutter eine Gesamtenergie von 12780 Kal. braucht,[2]) bei Verabreichung von 10,85 kg Haferstroh, 1,15 kg Bohnenschrot und 50 g Kochsalz 161 g Hippursäure.[3]) Würde nun der in letzterer enthaltene Stickstoff in Form von Harnstoff ausgeschieden, so müsste dessen Menge 27 g betragen. Weiterhin beziffert sich die Verbrennungswärme der ersteren (à 5,678 Kal.) auf 914,2 Kal., die der letzteren (à 2,537 Kal.) nur auf 68,5 Kal. Folglich betragen die Verluste in diesem angenommenen Beispiele 845,7 Kal., d. h. 66 % mehr vom Erhaltungsfutter, als wenn der Stickstoff in Form des Harnstoffs ausgeschieden würde. Da die Hippursäure mit ihren relativ grossen Verlusten besonders im Harn der Pflanzenfresser und somit auch unserer landwirtschaftlichen Nutztiere in erheblichen Mengen vorkommt, so darf es uns nicht wundernehmen, dass die Agrikulturchemie sich eingehend mit dem Studium der Entstehung dieses Körpers befasst hat. Die älteren Arbeiten hierüber sind schon öfter besprochen und kritisch behandelt.[4]) Es ergaben sich infolge der mangelhaften Bestimmungsmethode[5]) Widersprüche, und so sind diese älteren Untersuchungen späterhin nach Ausarbeitung einer zuverlässigen Methode[5]) einer nochmaligen kritischen Nachprüfung unterzogen, deren Resultate ich kurz folgen lasse.[6])

[1]) Verbrennungswärme von je 1 g Harnstoff = 2537 cal., Harnsäure = 2741 cal., Kreatin = 4275 cal., Hippursäure = 5678 cal.

[2]) O. Kellner, l. c. S. 61.

[3]) Henneberg, Neue Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. Göttingen 1870. Versuch 1860/61 No. 2.

[4]) Beitrag zur Frage über die Bildung von Hippursäure im tierischen Organismus, von Th. Pfeiffer und Wilh. Eber, unter Mitwirkung von K. Götze und O. Müller; Landw. Vers.-Stat. Bd. 49, 1898.

[5]) Kritische Prüfung derselben kfr. Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau Bd. II, Heft 2. Eine neue Methode zur Bestimmung der Hippursäure, von Th. Pfeiffer, C. Bloch und R. Riecke.

[6]) Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau Bd. II, Heft 4. Die Muttersubstanzen der im Organismus der Pflanzenfresser erzeugten Hippursäure, von Th. Pfeiffer, R. Riecke und C. Bloch. — Richard Riecke, Über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus. Inaugural-Dissertation. Breslau 1903.

Kohlenhydrate waren als Hippursäurebildner ausgeschlossen, da dieselben in leicht verdaulicher Form sogar eine geringe Abnahme des in Frage kommenden Harnbestandteiles bewirkten. Die einseitige Steigerung verdaulichen Eiweisses im Futter verursachte eine geringe Erhöhung der ausgeschiedenen Hippursäuremenge, indem wohl die aromatischen Spaltungsprodukte des Eiweisses zu Benzoesäure oxydiert wurden. Bei Verfütterung von Aleuronat oder Bohnenschrot stieg die Hippursäureausscheidung stark an, was nicht allein auf Grund des vorhandenen Eiweisses erklärt werden kann, sondern die Muttersubstanz dieser Säure muss auch noch in anderer Form enthalten sein. Die frühere Annahme,[1]) die im Futter vorhandenen Pentosen als eine Muttersubstanz der Hippursäure zu betrachten, erwies sich bei dieser spätern Nachprüfung nicht als stichhaltig. Denn reine Arabinose als Repräsentant der Pentosane blieb an der Bildung von Hippursäure unbeteiligt, jedoch enthält Kirschgummi die betreffende Muttersubstanz in erheblichen Mengen und auch die Arabinose ist hiervon nur schwer zu befreien. Kleeheu oder Leguminosenfutter überhaupt bewirkten im Vergleich zu Wiesenheu und Gramineen ebenfalls eine starke Depression der Hippursäureausscheidung; sie enthalten nur geringe Mengen der betreffenden Muttersubstanz und diese noch dazu in schwer verdaulicher Form. Die letztere ist im Wiesenheu zum grössten Teil in Wasser löslich (86 %); einen andern Teil hiervon enthält die Rohfaser, ein Gemenge von Zellulose mit kohlenstoffreicheren, inkrustierenden Substanzen, von denen das Lignin wesentlich in Betracht kommt. Dieses enthäht Pentosane und bisher noch nicht isolierte Stoffe der aromatischen Gruppe. Cross und Bewan,[2]) sowie Baly und Chorley[3]) bezeichnen die verholzten Fasern des Buchenholzes etc. als Lignozellulose und fassen sie als eine esterartige Verbindung von Zellulose mit „Nichtzellulose“ auf. Den beiden ersteren ist auch gelungen, durch Chlorieren und Bromieren aromatische Verbindungen, Abkömmlinge des Pyrogallols, darzustellen; auch in der oben zitierten Arbeit sind durch Oxydation von Futtermitteln mit Permanganat in alkalischer Lösung Benzolderivate als Benzoesäure nachgewiesen. Der Unterschied in der Hippursäureausscheidung bei der Verfütterung von Leguminosen und Gramineen ist nach Th. Pfeiffer dahin zu erklären, dass in ersteren die Hauptmenge (60 %) der im ganzen erzeugten Hippursäure auf die verdauliche Rohfaser entfällt, während dieser Bestandteil des Wiesenheus hierfür nur wenig in Betracht kommt, sondern hierin die Hauptmenge (86 %) der betreffenden Muttersubstanz in Wasser leicht löslich und verdaulich ist. Von den im Futter vorhandenen aromatischen Körpern kommt die Chinasäure, die O. Löw[4]) im Wiesenheu qualitativ nachgewiesen hat und die nach den Untersuchungen von Hupfer[5]) zur Vermehrung der Hippursäureausscheidung beiträgt, bei der Bildung derselben wahrscheinlich wenig in Betracht. In

[1]) Landw. Vers.-Stat. 1898, Bd. 49, S. 97 und 1896, Bd. 47, S. 59.
[2]) Tollens, Handbuch der Kohlenhydrate II, S. 271. Breslau 1895.
[3]) Bericht der Deutschen chem. Gesellschaft Bd. 28, 1895, S. 922.
[4]) Journ. für prakt. Chemie Bd. 127, S. 309 und ebenda Bd. 128, S. 476.
[5]) Zeitschr. für physiolog. Chemie Bd. 37, S. 302.

weit stärkerem Maße dürfte nach der oben zitierten Arbeit das Koniferin hieran beteiligt sein, das bei der Verfütterung und auch bei künstlicher Oxydation mit Kaliumpermanganat Hippursäure bezw. Benzoesäure erzeugt.

Gegen die Richtigkeit dieser letztgenannten Ausführungen sind aber Bedenken laut geworden,[1]) und obwohl für die Umwandlung des Koniferins in Hippursäure durch Reaktionen der qualitative Beweis erbracht ist und auch eine Elementaranalyse der hieraus gewonnenen Benzoesäure vorliegt, so dürften wohl eine nochmalige Bearbeitung der Streitfrage und ein Versuch zur Erforschung der Ursachen, welche die an und für sich merkwürdigen Reaktionen veranlassen, gerechtfertigt erscheinen.

An diese Nachprüfung, die ich in der vorliegenden Arbeit unternommen, schliesst sich dann eine Untersuchung verwandter Körper. Falls Koniferin bei der Oxydation wirklich Benzoesäure lieferte, so war vom Koniferylalkohol mit höchster Wahrscheinlichkeit ein gleiches Verhalten zu erwarten. Und in diesem Falle lag die Prüfung eines weitern Derivats der Protokatechusäure, der Vanillinsäure und endlich auch der Protokatechusäure selbst sehr nahe. Sobald dann diese Abkömmlinge der Dioxybenzoesäure auf die Entstehung von Benzoesäure bei der Oxydation geprüft waren, ging ich zu einem Derivat der Monooxybenzoesäure über, einem Homologen der Vanillinsäure, der Methyläthersalizylsäure. Die bei der künstlichen Oxydation im Laboratorium erhaltenen Resultate mussten sodann analog denjenigen sein, die ich bei Einführung dieser Substanzen in den Organismus erhielt. Eine Beigabe von Koniferin zum Grundfutter unterblieb, weil bereits ein derartiger Versuch vorlag, der zur Genüge bewies, dass dieser Körper die Hippursäureausscheidung beträchtlich erhöhte. Eine Verwendung von Koniferylalkohol zu diesem Zwecke war ausgeschlossen, da seine Darstellung aus Koniferin zu zeitraubend und kostspielig gewesen wäre. Es blieben mir noch Fütterungsversuche mit Vanillinsäure und Methyläthersalizylsäure übrig, die auch durchgeführt wurden und deren Resultate an den betreffenden Stellen angegeben sind.

Die früheren Arbeiten hatten bereits ergeben,[2]) dass der Tierkörper in keinem Falle mehr Hippursäure zu bilden vermag, als mit Hilfe der Oxydationsmethode aus den verabreichten Futtermitteln abgeleitet werden kann, und deshalb habe ich die in Frage kommenden Substanzen zunächst der künstlichen Oxydation unterworfen. Da jedoch die hierauf bezüglichen Angaben nicht genau genug gefasst sind,[3]) um Irrtümer vollständig auszuschliessen, so schicke ich eine eingehende Beschreibung dieser Methode voraus.

[1]) Vergl. Chemiker-Zeitung, Köthen, Jahrg. XXVIII, No. 26 vom 30. März 1904: „In der Diskussion — nämlich über den Vortrag: Die Muttersubstanz der im Organismus des Pflanzenfressers erzeugten Hippursäure, gehalten von Prof. Dr. Th. Pfeiffer in der chemischen Gesellschaft zu Breslau, Sitzung vom 4. März 1904 — bemerkte Geh.-Rat Ladenburg, dass er an der Bildung von Hippursäure aus Koniferin nach den Versuchen von Wöhler und Frerichs Zweifel haben müsse."

[2]) Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau, l. c.

[3]) Gattermann, Die Praxis des organischen Chemikers, 1902, 5. Aufl., S. 290. — Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau Bd. II, Heft 4, S. 700. — R. Riecke, l. c. S. 66.

Die betreffende Substanz (meist 1 g) wurde in einer Porzellanschale in verdünnter Lauge gelöst, 5—6 g festes Alkali hinzugetan und auf einem Sand- bezw. Wasserbade erwärmt. Dann fügt man vorsichtig unter stetem Rühren mit einem Glasstabe so viel festes Kaliumpermanganat hinzu, dass das Flüssigkeitsgemisch auch nach **mehrstündigem** Stehen in der Wärme die violette Farbe des Oxydationsmittels nicht mehr verliert. Den Überschuss des Permanganats reduziert man mit Alkohol, bis die über den Manganoxyden[1]) stehende Flüssigkeit völlig farblos erscheint. Dann dekantiert man letztere vor der Saugpumpe ab, übergiesst den Rückstand in der Schale mit siedendem Wasser, lässt absitzen, dekantiert wieder und fährt in dieser Weise so lange fort, bis das ablaufende Wasser auf Lackmus nicht mehr alkalisch reagiert. Hierzu ist je nach der Menge des auszuwaschenden Rückstandes ein Quantum von 2—10 l, ja bei der Oxydation grösserer Mengen von Futtermitteln stets noch mehr Waschwasser erforderlich. Dieses letztere dampft man in einer Porzellanschale auf ein kleines Volumen (ca. 50 ccm) ein, spült es — event. durch ein Filter, um die ins Filtrat gegangenen, aber beim Eindampfen zusammengeballten Teile von Manganoxyden zu entfernen — in einen Siedekolben von ca. 700 ccm, den man bei 100 ccm mit einer Marke versehen hat, und füllt bis zu dieser Stelle auf. Die hierin enthaltene Benzoesäure bestimmt man nach der von Pfeiffer, Bloch und Riecke ausgearbeiteten Methode.

Hiernach wird die Benzoesäure unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure[2]) durch Destillation von den anorganischen Salzen etc. getrennt, die übergegangene Flüssigkeit nach dem Vertreiben der Kohlensäure durch Wasserstoff alkalisch gemacht, stark eingedampft und in ein gekröpftes 50 ccm-Kölbchen übergespült. Der Inhalt des letztern wird dann genau neutralisiert, bis zur Marke aufgefüllt und dann mit 10, bezw. bei Anwesenheit grösserer Mengen Benzoesäure mit 20 ccm einer Schwefelsäure von bekanntem Gehalt beschickt. Nach 48stündigem Stehen im Eisschrank wird die abgeschiedene Säure abfiltriert und in einem aliquoten Teile des Filtrats nach seiner Erwärmung auf Zimmertemperatur die unverbrauchte Schwefelsäure mit Lauge zurücktitriert. Die gefundene Zahl rechnet man dann auf den Gesamtinhalt des Kölbchens um und subtrahiert sie von der Vorlage. Die hierbei restierende Lauge entspricht der ausgefällten und abfiltrierten Benzoesäure. Hierzu muss noch die in Lösung befindliche addiert werden, deren Menge nach der jeweils im Eisschrank herrschenden Temperatur aus der im Original enthaltenen Tabelle ersichtlich ist.

---

[1]) In den „Mitteilungen . . .“ l. c. wird das Reduktionsprodukt des Permanganats mit Manganoxydul bezeichnet, während man meist hierfür den Namen Braunstein findet. Jedoch dürften beide Ausdrucksweisen nicht als ganz einwandfrei gelten, da nach Gmelin-Kraut, Handbuch der Chemie, 6. Aufl., Heidelberg 1897, Bd. II, 2, S. 445, der braune Niederschlag aus einem äusserst wechselnden und stets kalihaltigen Gemenge von Manganoxyden besteht.

[2]) Der Zusatz grösserer Mengen konzentrierter Schwefelsäure bedingt einen wesentlich höheren Siedepunkt und damit eine verhältnismässig schnelle Verflüchtigung der Benzoesäure.

Diese Methode liefert sehr genaue Resultate. Neben den im Original vorhandenen Belegzahlen, auf die ich hiermit wohl verweisen darf, führe ich die von mir erzielten Resultate an: 50 ccm Hammelharn enthielten 0,81460 bezw. 0,81725 g Hippursäure; nach Zusatz von 0,5 g chemisch reiner Hippursäure wurden wiedergefunden 1,30091 bezw. 1,31856 g. Nimmt man von beiden Werten die Mittelzahlen und bildet die Differenz, so ergibt sich, dass von den zugesetzten 0,5 g Hippursäure 0,49381 g, d. h. 98,76% sich wiederfanden. Angesichts der von den Autoren und mir erprobten Brauchbarkeit der angegebenen Methode ist es um so auffallender, dass Julius Schmid[1]) hierbei ein Defizit von 9,7—13% bei der dem Harn zugesetzten Hippursäure findet. Da letzterer bei der Bestimmung dieser Säure aus Wasser von 0,5 g 0,495 bezw. 0,493 g erhielt, beim Zusatz von Hippursäure zum Harn aber 10—13% zu wenig, so glaube ich diesen Umstand vielleicht dadurch erklären zu können, dass J. Schmid im letztern Falle bei dem stets etwas gelblich gefärbten Harndestillat die Neutralisation nicht mit der erforderlichen Genauigkeit durchgeführt hat. Hierauf ist aber stets mit möglichst peinlicher Sorgfalt zu achten, und das Erkennen des Farbenumschlages wird bei dunkler gefärbten Harndestillaten wesentlich erleichtert, wenn man in das Kölbchen noch eine Spur festes Phenolphthalein hinzutut. Trotz des vorhergehenden Durchleitens von Wasserstoff zog sich die Neutralisation bisweilen tagelang hin, indem durch die sehr schwache Salzsäure jedesmal nur ein kleiner Teil des vorhandenen Monokaliumkarbonats[2]) zerlegt und dann immer wieder nach Vertreiben des Kohlensäureanhydrids durch Erwärmen im Wasserbade eine Rotfärbung eintrat. Doch darf man sich diese Mühe nicht verdriessen lassen, indem nach meiner persönlichen Erfahrung etwaige Fehler nur hier ihre Quelle haben. Eine zweite Modifikation, zu der ich mich bei der Fütterung mit Vanillinsäure genötigt sah, ist weiter unten an der betreffenden Stelle erwähnt.

Es ist zwar die Bestimmung der Benzoesäure durch Oxydation mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung eine langwierige und komplizierte Methode, die auch auf absolut quantitative Genauigkeit keinen Anspruch machen kann, da infolge der dazu erforderlichen Operationen, z. B. Arbeiten mit grossen Flüssigkeitsmengen, Fehlerquellen nicht ganz ausgeschlossen sind; trotsdem erhält man bei vorsichtigem und genauem Arbeiten und bei einiger Übung brauchbare Resultate.

Nach Gattermann[3]) braucht man weniger Alkali anzuwenden, nämlich 3 g auf 5 g Substanz, jedoch glaube ich gefunden zu haben, dass die Oxydation in einer stärker alkalischen Lösung in kürzerer Zeit vollständiger verläuft und der Farbenumschlag von Grün in Violett nach beendeter Oxydation sich früher und deutlicher erkennen lässt. Weiterhin ist auch ein grösserer Überschuss von Kaliumpermanganat tunlichst zu vermeiden, da sonst bei der Reduktion des überschüssigen Oxydationsmittels durch Alkohol zuviel Essigsäure entsteht. Diese erschwert, ja macht bisweilen

[1]) Zentralblatt für innere Medizin 1905, 26, S. 81.

[2]) Nicht Monokalziumkarbonats, wie es infolge Druckfehlers im Original heisst.

[3]) l. c. S. 290.

das quantitative Bestimmen der Benzoesäure unmöglich, da im 50 ccm-Kölbchen durch die hinzugefügte titrierte Schwefelsäure zunächst Essigsäure frei wird und dann erst bei Überschuss von Mineralsäure (Prüfung mit Kongorotpapier) die Benzoesäure zur Abscheidung gelangt. Beobachtet man diesen letztgenannten Umstand nicht, so muss man eine grosse Menge, bisweilen das Zehnfache der bei normalem Arbeiten notwendigen Schwefelsäuremenge anwenden, wobei ein quantitatives Arbeiten nach der oben erwähnten Methode undenkbar ist.

In solcher Weise gelangten Koniferin, Koniferylalkohol, Vanillinsäure und Methyläthersalizylsäure zur Oxydation.

Auch ich bemerkte, wie schon früher in den oben zitierten Arbeiten erwähnt ist, bei der Überdestillation der aus Koniferin gewonnenen Benzoesäure eine rötlich gefärbte Flüssigkeit, die bei der Neutralisation im Kölbchen grünlich wurde. Die theoretische Ausbeute musste, je nachdem man mit der wasserfreien oder kristallisierten Substanz arbeitet, 0,3567 bezw. 0,3227 g Benzoesäure[1]) liefern. Ich erhielt aus je 1 g sorgfältig im Exsikkator getrockneten Koniferins bei der Oxydation folgende Mengen an Benzoesäure:

irekt titrierte Benzoe-				
säure	0,23535 g	0,27918 g	0,25218 g	0,26009 g
ösungskoeffizient . .	0,15022 „ (10° in 70 ccm)	0,12684 „ (9,5° in 60 ccm)	0,15477 „ (11° in 70 ccm)	0,13464 „ (11,5° in 60 ccm)
Gesamtbenzoesäure:	0,38557 g	0,40602 g	0,40758 g	0,39473 g.
on der theoretisch				
möglichen Menge . .	109 %	115 %	115,3 %	111,9 %.

Während ich stets prozentisch zu hohe Werte erhielt, fand Riecke eine bedeutend geringere Ausbeute, nämlich aus 5 g Koniferin nur eine Benzoesäuremenge, die 1,1037 g Hippursäure entsprach. Es findet dieser Unterschied darin seine Erklärung, dass Riecke ein Material benutzt hatte, welches sich nach seinen eigenen spätern Untersuchungen nur als lufttrocken erwies,[2]) während ich das Koniferin, das, schon an der Luft durch Wasserabgabe verwittert,[3]) wochenlang in dünner Schicht im Exsikkator über Schwefelsäure trocknete. Vielleicht sind hierbei noch tiefer gehende Zersetzungen eingetreten, worauf der schwache Geruch nach Vanillin hinzudeuten schien und woraus dann auch bei dem geringern Molekulargewicht des letztern meine prozentisch stets zu hohen Werte für die bei der Oxydation entstandene Benzoesäure eine Erklärung fände. Versucht fühle ich mich auch, diesen Umstand dem Lösungskoeffizienten[4]) zuzuschreiben, da dieser für Wasser berechnet in der sauren Flüssigkeit nach dem Massenwirkungsgesetz und ausserdem bei der noch damals herrschenden hohen

[1]) Riecke (l. c. S. 80) gibt an, dass 10 g Koniferin 3,6 g Hippursäure liefern, es soll jedoch 3,6 g Benzoesäure heissen. Ferner ist in der Anmerkung derselben Seite 1,1037 g Hippursäure für 1,1037 g Benzoesäure zu setzen.

[2]) Diese Berichtigungen gebe ich im Einverständnis mit Herrn Dr. Riecke.

[3]) v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten, 1895, S. 235.

[4]) Tabelle hierfür in Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau Bd. II, 2, S. 284.

Temperatur[1]) sehr hoch ist und der Fehler mit der Grösse der durch den Lösungskoeffizienten ermittelten Zahl natürlich wächst. Die aus Koniferin gewonnene Benzoesäure reinigte ich durch Sublimation und unterwarf sie der Elementaranalyse, die folgende Zahlen lieferte:

	Berechnet	Gefunden
C =	68,85 %	69,19 %.
H =	4,92 „	5,18 „

Ich kann daher die früher am Koniferin gemachten Beobachtungen nur bestätigen. Es hat sich tatsächlich bei der Oxydation hieraus durch eine gleichzeitige Reduktion und Oxydation Benzoesäure gebildet.

Es lag jetzt der Gedanke nahe, zu untersuchen, wie sich der dem Koniferin nächstverwandte Körper, der Koniferylalkohol $C_6H_3\begin{matrix}OH\\O.CH_3\\C_3H_5.OH\end{matrix}$ bei der Oxydation verhalten würde. Ich erhielt hiervon freundlichst ca. 5 g von Herrn Dr. Riecke, ca. 8 g habe ich persönlich dann aus 30 g Koniferin durch Spaltung mit Emulsin dargestellt. Auch dieser Körper lieferte Benzoesäure, und zwar in folgenden Mengen:

Angewandt:	0,76 g Koniferylalkohol	0,72 g Koniferylalkohol
Direkt titrierte Benzoesäure	0,24317 g	0,17534 g
Lösungskoeffizient bei 7° in 60 ccm .	0,11778 „	0,11778 „
Gesamtbenzoesäure:	0,36095 g	0,29312 g.
Von der theoretisch möglichen Menge .	70,08 %	60,08 %.

Da bei der Oxydation des Koniferylalkohols bedeutend weniger von der theoretisch möglichen Benzoesäuremenge gebildet wurde als bei der des Koniferins, so dürfte wohl bei letzterm die Glykose-Gruppe zur vermehrten Reduktion beigetragen haben. Dass Traubenzucker ausserhalb des Moleküls diese Wirkung nicht zeigt, wird weiter unten an der betreffenden Stelle dargelegt werden.

Die ausgefällte und abfiltrierte Säure wurde durch Sublimation gereinigt und besass folgende Zusammensetzung:

	Berechnet	Gefunden
C =	68,85 %	68,70 %.
H =	4,92 „	5,03 „

Der dem Koniferylalkohol nächstverwandte Körper, die Vanillinsäure $C_6H_3\begin{matrix}OH\\O.CH_3\\COOH\end{matrix}$ wurde dann ebenfalls nach oben erwähnter Methode der Oxydation unterworfen. Darauf bestimmte ich in der vom Niederschlag abfiltrierten Lösung die Benzoesäure und erhielt bei 1 g angewandter Substanz folgende Quantitäten:

Direkt titrierte Benzoesäure .	0,38740 g	0,46947 g	0,37600 g
Lösungskoeffizient	0,15708 „ $\left(\frac{11,5°\text{ in}}{70\text{ ccm}}\right)$	0,12498 „ $\left(\frac{9°\text{ in}}{60\text{ ccm}}\right)$	0,12684 „ $\left(\frac{9,5°\text{ in}}{60\text{ ccm}}\right)$
Gesamtbenzoesäure:	0,54448 g	0,59445 g	0,50684 g.
Von der theoretisch möglichen Menge	75,04 %	81,93 %	69,3 %.

[1]) Diese Untersuchungen fallen in die heissen Sommermonate 1904, wo sogar im täglich frisch gefüllten Eisschrank je nach der Luftwärme die Temperatur bis auf 16° C. und darüber stieg. Abhilfe konnte erst dadurch geschaffen werden, dass der Eisschrank im Keller des Instituts aufgestellt wurde.

Die aus der Vanillinsäure bei der Oxydation erhaltene Benzoesäure reinigte ich durch zweimaliges Umkristallisieren und unterwarf sie der Elementaranalyse:

	Berechnet	Gefunden	
C =	68,85 %	67,70 %	67,90 %.
H =	4,92 „	5,21 „	5,01 „

Die Abweichung ist hier etwas grösser als bei den entsprechenden Untersuchungen der aus Koniferin und Koniferylalkohol dargestellten Benzoesäure, doch dürften sich hieraus keine Bedenken gegen die Bildung genannter Säure aus Vanillinsäure ergeben.

Koniferin, Koniferylalkohol lieferten nach meiner Oxydationsmethode Benzoesäure; nach Tiemann und Haarmann[1]) entsteht aus diesen Körpern beim Schmelzen mit Kali Protokatechusäure. Es wäre also möglich, dass auch bei meinen Versuchen zunächst diese Säure und dann hieraus die erstgenannte sich gebildet hätte. Doch bei einer Oxydation reiner Protokatechusäure liess sich auch nicht einmal qualitativ die in Frage kommende Säure nachweisen, so dass die eben erwähnte Annahme nicht aufrecht erhalten werden kann.

Nachdem diese Derivate der Dioxybenzoesäure bei der Oxydation in alkalischer Lösung eine Reduktion zu Benzoesäure erfahren hatten, wurde ein Derivat der Monooxybenzoesäure, die Methyläthersalizylsäure, auf ihr Verhalten in dieser Hinsicht untersucht. Den letzten Körper stellte ich mir selbst dar. Da seine Gewinnung durch Erhitzen von Gaultheriaöl (Salizylsäuremethylester), Jodmethyl und alkoholischem Kali im Bombenrohr und die Verseifung des hierbei entstandenen Salizylsäuremethyläthermethylesters $C_6H_4 \begin{matrix} CO.OCH_3 \\ O.CH_3 \end{matrix}$[2]) kompliziert ist und wenig Ausbeute lieferte, wurde folgende bequemere Methode[3]) ausschliesslich angewandt: 110 g Gaultheriaöl wurden in einem mit aufsteigendem Kühler versehenen Kolben im Ölbade auf 200—250° erhitzt und allmählich so viel metallisches Natrium (ca. 10—12 g) in kleinen Stücken hinzugefügt, als sich in zwei bis drei Stunden löste. Die Bildung des gewünschten Körpers kann nach Graebe entweder so vor sich gehen, dass in einem Molekül methyläthersalizylsaurem Natrium ein gegenseitiger Wechsel der Plätze zwischen der Na- und Methyl-Gruppe stattfindet, oder so, dass zwei Moleküle aufeinander einwirken und die durch folgende Gleichung ausgedrückte Umsetzung stattfindet:

$$C_6H_4 \begin{matrix} O.Na \\ COO.CH_3 \end{matrix} + \begin{matrix} CH_3.COO \\ Na.O \end{matrix} C_6H_4 = 2C_6H_4 \begin{matrix} O.CH_3 \\ COONa \end{matrix}.$$

Die im Kolben nach dem Abdestillieren des nicht in Reaktion getretenen Gaultheriaöls zurückbleibende Kristallmasse ist das Na-Salz der Methyläthersalizylsäure, verunreinigt durch salizylsaures und methylestersalizylsaures Natrium. Diese Salze werden mit Salzsäure zerlegt und beim Erkalten oder öfters erst nach mehrtägigem Stehen im Eischrank scheiden sich

---

[1]) Ber. VII, S. 617.

[2]) Ann. 139, S. 137 ff. Carl Graebe, Über Methylsalizylsäure.

[3]) Ann. 142, S. 327. Derselbe, Über eine neue Bildungsweise der Methylsalizylsäure.

die freien Säuren ab. Diese letztern werden an der Saugpumpe möglichst von den anhaftenden ölförmigen Verunreinigungen getrennt und durch mehrstündiges Digerieren mit Kalkmilch gereinigt, indem methyläthersalizylsaurer Kalk in Lösung bleibt und von dem schwer löslichen salizylsauren Kalk abfiltriert wird. Das Filtrat säuert man mit Salzsäure an, filtriert die nach mehrstündigem Stehen im Eisschrank abgeschiedene Methyläthersalizylsäure ab und kristallisiert sie dann so lange aus siedendem Wasser um, bis die letzten Spuren von Salizylsäure entfernt sind, was an dem Ausbleiben der Eisenchloridreaktion deutlich zu erkennen ist. Der so dargestellte Körper zeigte den richtigen Schmelzpunkt von 98°.

Zunächst war es bei der Oxydation dieser Substanz auffallend, dass relativ wenig Kaliumpermanganat (ca. 1 g auf 1 g Säure) genügte, um eine bleibende Rötung hervorzurufen. Beim Überdestillieren des durch Auswaschen des Niederschlages gewonnenen und eingedampften Filtrats gingen einige Flocken über, zugleich machte sich ein unangenehmer (benzolartiger?) Geruch bemerkbar. Beim Eindampfen des neutralisierten Destillats konnte man einen intensiven Phenolgeruch wahrnehmen. Die ausgefällte Säure, die sich schon äusserlich durch ihre feineren Nadeln nicht als Benzoesäure charakterisierte, erwies sich auch später durch die Eisenchloridreaktion nicht als solche, sondern als Salizylsäure. Diese wurde als Dibromsalz ausgefällt, abfiltriert und im Filtrat Benzoesäure nachzuweisen versucht, jedoch ohne Erfolg. Es ist also trotz der Oxydation der Methyläthersalizylsäure in alkalischer Lösung eine Reduktion zur Salizylsäure, ja sogar bis zum Phenol eingetreten: $C_6H_4 \begin{cases} O.CH_3 \\ COOH \end{cases} \longrightarrow C_6H_4 \begin{cases} OH \\ COOH \end{cases} \longrightarrow C_6H_5 . OH.$

Je ein Gramm Methyläthersalizylsäure wurde wie oben angegeben oxydiert und die hierbei entstandene Säure nach der gleichen Methode bestimmt wie die Benzoesäure, nämlich durch Ausfällen der überdestillierten und eingedampften Säure im 50 ccm-Kölbchen bei Zusatz von 10 ccm titrierter Schwefelsäure. Dabei erhielt ich folgende Mengen:

Direkt titrierte Salizylsäure	0,26281 g	0,30337 g
Lösungskoeffizient[1]) bei 9° in 60 ccm	0,11052 „	0,11052 „
Gesamtsalizylsäure:	0,37333 g	0,41389 g.
Von der theoretisch möglichen Menge	40,18 %	45,59 %.

Die im Kölbchen ausgefällte, weiterhin nicht gereinigte Säure wurde im Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet und titriert; es entsprachen 0,16 g = 0,15109 g Salizylsäure. Ebenso wurden 0,16 g durch Bromwasser in Salizylsäuredibromid und unter den unten[2]) angegebenen Vorsichtsmassregeln titriert; hierbei entsprachen 0,16 g = 0,1849 g Salizylsäure. Es müssen also noch etwas Phenol oder ähnliche mit Brom reagierende Körper im Fällungsprodukt enthalten gewesen sein; da mich jedoch eine nähere Untersuchung zu weit von meinem Thema entfernt hätte, so unterblieb sie. Die überraschende Reduktion der Methyläthersalizylsäure zu Phenol, die ich bereits oben erwähnt habe, veranlasste mich, zuzusehen,

[1]) Nach Bourgoin, Bl. 31, 57, der die Löslichkeit der Salizylsäure von 0° bis 35° durch die Gleichung $x = (y^2 + 10y + 750) . 0{,}0002$ bestimmt, worin x die bei y^0 in 1000 ccm Wasser in Lösung befindliche Salizylsäuremenge in Gramm angibt.

[2]) S. 18.

ob ich noch anderweitig als durch den blossen Geruch einen qualitativen Beweis hierfür erbringen könnte. Da die nach der Oxydation vom Niederschlage abfiltrierte, stark eingedampfte Flüssigkeit, die durch Überdestillieren nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure von den Alkalisalzen getrennt war, keinen Phenolgeruch zeigte, so muss es wohl in Form einer Verbindung übergegangen sein. Denn als ich das Destillat wieder in einen Siedekolben brachte, deutlich alkalisch machte und von neuem destillierte, zeigte sich erst der charakteristische Phenolgeruch. Proben, in einem Reagenzglase aufgefangen, gaben mit Bromwasser eine starke Fällung von Tribromphenol,[1]) mit Eisenchlorid jedoch gelang infolge der geringen Phenolmenge die Reaktion nicht. Als spezifisches Erkennungsmittel, welches sich nach meinen Versuchen als sehr geeignet erwies, auch Spuren von Phenol neben grossen Mengen von Salizylsäure gut anzuzeigen, hatte sich Eykmanns Reagens[2]) erprobt: Eine Probe meines Destillats mit einigen Tropfen Äthylnitrit in Alkohol (Spiritus ätheris nitrosi) und dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure versetzt, ergab die für Phenol charakteristische rosenrote Färbung. Ob sich neben Phenol und Salizylsäure bei der Oxydation von Methyläthersalizylsäure noch andere Körper gebildet haben könnten, worauf der erwähnte eigentümliche Geruch des ersten Destillats hindeutete, habe ich aus den bereits angegebenen Gründen nicht untersucht.

Aus Koniferin $C_6H_3 \begin{cases} O.C_6H_{11}O_5 \\ O.CH_3 \\ C_3H_4.OH \end{cases}$, Koniferylalkohol $C_6H_3 \begin{cases} OH \\ O.CH_3 \\ C_3H_4.OH \end{cases}$ und aus Vanillinsäure $C_6H_3 \begin{cases} OH \\ O.CH_3 \\ COOH \end{cases}$ hatte sich bei der Oxydation nach obiger Methode Benzoesäure gebildet, dagegen aus Methyläthersalizylsäure $C_6H_4 \begin{cases} O.CH_3 \\ COOH \end{cases}$ nicht. Hieraus glaube ich den Schluss ziehen zu dürfen, dass bei der Behandlung mit Permanganat in alkalischer Lösung die $O.CH_3$-Gruppe für sich allein nicht zu H reduziert wird, sondern dass hierzu ein Zusammenwirken der $O.CH_3$- mit einer OH-Gruppe erforderlich ist. Ob etwa $O.CH_3$ zunächst zu Ameisensäure bezw. zu einer esterartigen Verbindung derselben mit dem Benzolrest oxydiert wird, die ja bekanntlich ein starkes Reduktionsvermögen besitzt, und ob dieses Produkt dann in zweiter Linie auf die benachbarte OH-Gruppe einwirkt oder ob andere Faktoren beteiligt sind, lasse ich unentschieden, ebenso fehlt mir für die Reduktion der Methyläthersalizylsäure bis zum Phenol jede Erklärung.

Weiterhin war es bei diesen Oxydationen auffallend, dass nur Koniferin die theoretisch quantitativ mögliche Benzoesäuremenge lieferte, und deshalb lag die Vermutung nahe, dass die Glykose-Gruppe, die ja an und für sich gleichfalls reduzierende Eigenschaften besitzt, wesentlich zur vermehrten Bildung von Benzoesäure beitrüge. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob Zucker auch ausserhalb des Moleküls diese Wirkung zeige, wurden Koniferylalkohol und Vanillinsäure nach Zusatz von chemisch reiner Glykose oxydiert. Wie aus den unten stehenden Tabellen ersichtlich, hat diese Massnahme keinen sonderlichen Einfluss ausgeübt.

[1]) Von Salizylsäure konnte diese Fällung nicht herrühren, weil diese als Natriumsalz im Kolben zurückgehalten wurde.

[2]) Mercks Reagentienverzeichnis.

Angewandt:	0,762 g Koniferylalk. + 2 g Zucker	0,81 g Koniferylalk. + 2 g Zucker
Direkt titrierte Benzoesäure	0,30588 g	0,23759 g
Lösungskoeffizient	0,11436 „ (6° in 60 ccm)	0,11778 „ (7° in 60 ccm)
Gesamtbenzoesäure:	0,42024 g	0,35537 g.
Von der theoretisch möglichen Menge	81,5 %	64,7 %.

Angewandt:	1 g Vanillinsäure + 1 g Glykose	1 g Vanillinsäure + 5 g Glykose	1 g Vanillinsäure + 6 g Glykose
Direkt titrierte Benzoesäure .	0,36267 g	0,38408 g	0,35453 g
Lösungskoeffizient	0,13668 „ ($\frac{12°\text{ in}}{60\text{ ccm}}$)	0,12132 „ ($\frac{8°\text{ in}}{60\text{ ccm}}$)	0,12132 „ ($\frac{8°\text{ in}}{60\text{ ccm}}$)
Gesamtbenzoesäure:	0,49935 g	0,50540 g	0,47585 g.
Von der theoretisch möglichen Menge	68,76 %	69,48 %	65,42 %.

Nachdem ich bisher gezeigt, dass trotz der Oxydation die Derivate der Dioxybenzoesäuren aus noch nicht aufgeklärten Gründen eine Reduktion zu Benzoesäure erfahren hatten, der Methyläther der Monooxybenzoesäure aber nicht, komme ich zum zweiten Teil meiner Arbeit, den Tierversuchen. Aus den bereits oben angeführten Gründen konnte ich mich darauf beschränken, das Verhalten der Vanillinsäure und Methyläthersalizylsäure bei ihrem Durchgang durch den Organismus zu prüfen. Beide Versuche wurden an Hammeln durchgeführt, und zwar bei Vanillinsäure mit zwei, bei Methyläthersalizylsäure wegen der schwierigen Beschaffung des Materials mit einem Tiere. Dieselben gehörten einer kleinen Rasse an und hatten sich bei früheren Versuchen als brauchbar zu diesem Zweck erwiesen. Sie wurden in dem bekannten Zwangsstall untergebracht, wodurch ein verlustfreies Sammeln von Kot und Harn ermöglicht wird. Die Fütterung fand dreimal am Tage statt: morgens um 8 Uhr, mittags um 12 Uhr und nachmittags um 5 Uhr. Die Wasseraufnahme war eine regelmässige, ca. 1 l pro Tag; Futterreste waren nie zu verzeichnen. Die Temperatur des Stalles betrug durchschnittlich 12° C. Der eigentlichen Fütterung ging selbstverständlich eine achttägige Vorfütterung mit der Versuchsration voraus, während welcher keine Untersuchung stattfand. Das Befinden der Tiere war ein normales. Als Grundfutter wurde ein solches von geringem Hippursäurebildungsvermögen gewählt, Luzernehen. Hiervon wurden ca. 2 Zentner geschnitten und aus diesem Bestande für jede Periode mit Einschluss der Vorfütterung die Tagesrationen im voraus abgewogen und in Blechkästen aufbewahrt. Es gelangten pro Tag zur Verfütterung 700 g Heu nebst 100 g Weizenschalen, unter welche die Vanillinsäure bezw. die Methyläthersalizylsäure an den betreffenden Tagen gemischt wurden. Die tägliche Harnmenge betrug 600—700 ccm; sie wurde stets bei sämtlichen Perioden auf 1000 ccm aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und aliquote Teile hiervon zur Analyse verwandt.

Als ich sodann mit der Zulage von Vanillinsäure[1]) begann, stellte es sich heraus, dass das Harndestillat beim Eindampfen mit Kali und unter

[1]) Ein Fütterungsversuch mit Vanillinsäure lag noch bislang nicht vor. Preusse (Hoppe-Seyler IV, S. 213) fand, dass Vanillin vom Organismus zu Vanillinsäure oxydiert wurde und dann grösstenteils gepaart als Ätherschwefelsäure, in geringer Menge auch frei ausgeschieden wurde. Während des Druckes dieser Abhandlung erschien eine Arbeit von J. Kotake (Hoppe-Seyler XLV, S. 320), der das vom Tierkörper zu Vanillinsäure oxydierte Vanillin auch zum Teil mit Glykuronsäure gepaart im Harn wiederfand. Dieser Körper ist

dem Einfluss des zum Nachspülen verwandten Alkohols eine fast tintenartige Färbung annahm und somit eine Neutralisation im Kölbchen sich mir als unmöglich erwies. Ich musste daher den Fütterungsversuch abbrechen und die Methode der Hippursäurebestimmung in brauchbarer Weise zu variieren versuchen. Dieses gelang mir dadurch, dass ich das zuerst gewonnene Destillat in stark alkalischem Zustande eindampfte und dann nochmals wie vorher die Benzoesäure abdestillierte, wodurch der Farbstoff sich verlor. Der Harn wurde bei der Vanillinsäurefütterung bei längerem Stehen dunkel, bezw. es bildete sich oben ein braungefärbter Ring; eine Probe hiervon mit essigsaurem Blei behandelt und dann mit einem Tropfen Salzsäure versetzt gab mit Eisenchlorid eine Grünfärbung, die beim Hinzufügen von Soda zunächst blau und in kurzem rot wurde, eine Reaktion, die für Protokatechusäure charakteristisch ist. Hierin scheint sich auch ein grosser Teil der verabreichten Vanillinsäure umgewandelt zu haben, denn eine Vermehrung der Hippursäure bezw. Benzoesäure im Harn war nicht in dem Maße eingetreten, wie man es nach den Oxydationsversuchen hätte erwarten dürfen. Durch Zulage von Vanillinsäure, und zwar an zwei Tagen à 5 g und an den zwei darauf folgenden à 10 g, stieg die Menge des in Frage kommenden Harnbestandteiles nur mässig an.[1]) Hammel I lieferte im Durchschnitt aus dem Grundfutter 2,31623 g Benzoesäure bei einem wahrscheinlichen Fehler[2]) von $\pm$ 0,2548 und diese Säure erreichte bei der oben angegebenen Zulage in 4,02560 g ihren Höhepunkt. Hammel II produzierte aus dem Grundfutter im Mittel 3,0007 g Benzoesäure[3]) bei einem wahrscheinlichen Fehler von $\pm$ 0,0363 und durch die oben genannte Beigabe steigerte sich diese auf 4,7867 g. Im erstern Falle hatte der Tierkörper aus 1 g der verabreichten Vanillinsäure 0,1405 g Benzoesäure oder 19,35 %, im zweiten 0,1226 g Benzoesäure oder 16,98 % der theoretisch möglichen Menge erzeugt; die künstliche Oxydation hingegen lieferte eine höhere Ausbeute an Benzoesäure, im Mittel 0,54859 g aus einem Gramm Vanillinsäure, d. h. 75,42 %. Jedoch ergibt sich aus meinen Versuchen, dass Vanillinsäure zur Bildung von Benzoesäure befähigt und auch vom tierischen Organismus wirklich zur Erzeugung von Hippursäure herangezogen wird. Die Benzoesäure, welche ich aus dem Harn der Grundperiode und aus dem bei Vanillinsäurezulage gewonnen hatte, unterwarf ich nach einmaliger Reinigung durch Sublimation der Elementaranalyse und erzielte folgendes Resultat:

linksdrehend, reduziert aber nicht alkalische Kupferlösung. Preusse hat hiervon keine Spur gefunden, obwohl auch er seine Aufmerksamkeit auf „einen die Polarisationsebene drehenden oder Kupferoxyd reduzierenden Körper“ gerichtet hatte.

[1]) Die hierzu gehörigen tabellarischen Zusammenstellungen finden sich auf S. 27.

[2]) Vergl. Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau Bd. II, 4, S. 647: Th. Pfeiffer, Die sogen. statistische Methode der Felddüngungsversuche und die Ausgleichsrechnung; ferner Landw. Jahrbücher 1903, Bd. 32: A. Mitscherlich, Landw. Vegetationsversuche. Die Formel für den wahrscheinlichen Fehler des arithmetischen Mittels lautet: $R = 0{,}6744898 \cdot \sqrt{\frac{[v^2]}{n \cdot (n-1)}}$, worin bedeutet v die Differenz vom arithmetischen Mittel sämtlicher Beobachtungen und der Einzelbeobachtungen, n die Anzahl der letztern.

[3]) Dass aus demselben Grundfutter Hammel II ca. 0,7 g Benzoesäure mehr erzeugte als Hammel I, kann ich nur auf Grund individueller Verschiedenheit der beiden Versuchstiere erklären.

	Berechnet	Gefunden bei der Benzoesäure der Vorfütterung		der Vanillinsäurezulage	
C =	68,85 %	68,94 %	68,91 %	68,26 %	68,40 %.
H =	4,92 „	4,98 „	5,09 „	4,96 „	5,25 „

Diese Zahlen bürgen dafür, dass bei der Grundfütterung wie bei der Beigabe des obigen aromatischen Körpers die im Kölbchen abgeschiedene Säure wirklich Benzoesäure war.

Bei der Oxydation von Methyläthersalizylsäure hatte sich Salizylsäure gebildet und deshalb war eine solche Spaltung im Organismus mit grosser Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Da die letztere jedoch zum Teil in ein Analogon der Hippursäure, in die Salizylursäure[1]) (= Oxyhippursäure) übergeht, so sah ich mich veranlasst, eine Methode zu suchen, durch welche ich die aus dem Grundfutter stammende Hippursäure, ferner die aus dem Salizylsäuremethyläther gebildete freie, d. h. an Na gebundene Salizylsäure und die an andere organische Körper gebundene Salizylsäure quantitativ bestimmen könnte. Die Literatur über das Verhalten der Salizylsäure im Organismus ist sehr umfangreich.

Nach E. Baumann und E. Herter,[2]) welche die Einwirkung der drei Oxybenzoesäuren auf den Organismus prüften, steigerten 3,5 g Salizylsäure bei einem Hunde die Ausscheidung der Ätherschwefelsäure, was sie auf die Bildung einer Salizylschwefelsäure zurückführten, ohne jedoch letztere im Harn nachweisen zu können. Ein Versuch an Kaninchen und am Menschen zeigte diese Erscheinung nicht. Weiterhin stellten diese beiden Autoren fest, dass ein Teil der Säuren unverändert den Organismus passiere, ein anderer Teil in der Hippursäure in analoge Verbindungen übergehe.

Nencki,[3]) der unter anderm das Verhalten des Resorzinsalizylsäureesters im Organismus untersuchte, fand, dass der Harn mit Eisenchlorid eine Violettfärbung zeigte, konnte aber die erwartete Salizylursäure im Harn nicht feststellen.

M. Lesnik,[4]) der die Spaltung des salizylsauren α- und β-Naphthols im Körper verfolgte, zeigte, dass die beiden Verbindungen bei Versuchen am Menschen in Form der Ätherschwefelsäure, Naphtholglykuronsäure, Salizylursäure und einer Substanz (von der doppelten Formel der Salizylursäure $+ C_3H_4O =) C_{21}H_{22}N_2O_9$ zur Abscheidung gelangten.

Fräulein Chopin[5]) versuchte eine quantitative Bestimmung der in den Organismus eingeführten Salizylsäure. Hierzu dampfte sie den betreffenden Harn auf $^1/_5$ seines Volumens ein, säuerte ihn mit Phosphorsäure an und

[1]) C. Bertagnini, Über das Verhalten einiger Säuren im tierischen Organismus; Ann. 97, S. 248.

[2]) Hoppe-Seyler, Zeitschrift für physiolog. Chemie I, S. 244.

[3]) M. Nencki, Über die Spaltung der Säureester der Fettreihe und der aromatischen Verbindungen im Organismus und durch das Pankreas; Archiv f. experiment. Path. und Pharm. 20, S. 367.

[4]) M. Lesnik, Über das Verhalten einiger Ester der Salizylsäure im Organismus; ebenda 24, S. 167.

[5]) Elimination de l'acide salicylique suivant des divers états des reins . . . Brochure. Paris 1889.

schüttelte ihn dann mit Äther aus. Die Bestimmung der Salizylsäure geschah dadurch, dass der eingetrocknete Rückstand der Ätherlösung auf 140° erhitzt, hierin durch Titration der Säuregrad bestimmt und von dem gefundenen Werte jener abgezogen wurde, der bei der gleichen Behandlung normalen Harns gewonnen war. Die Differenz wurde auf Salizylsäure berechnet. Chopin fand durchschnittlich 75% der in den Organismus eingeführten Salizylsäure im Harn wieder. Diese ihre Methode ist bereits in Mossos Arbeit[1]) scharf kritisiert worden. Der Verfasser weist darauf hin, dass auf andere Harnsäuren keine Rücksicht genommen ist, und dass die Titration zu ganz falschen Resultaten führen muss, wenn beim Erhitzen des Rückstandes auf 140° auch nur geringe Verunreinigungen vorhanden sind, die sich unter Abspalten von Ammoniak zersetzen. Ich möchte noch hinzufügen, dass freie Salizylsäure sich beim Erhitzen auf 140° quantitativ verflüchtigt. Wenigstens gibt C. Bertagnini[2]) an, Salizylursäure in der Weise rein dargestellt zu haben, dass er das aus Harn erhaltene Gemenge von Salizylsäure und Salizylursäure durch Erhitzen im Luftstrom bei 140 bis 150° vollständig zu trennen vermochte, indem die erstere sich verflüchtigte, letztere aber nicht.

Ugolino Mosso[3]) hat sodann folgende Methode ausgearbeitet, die ich hier im wesentlichen kurz anführe: Nachdem seine Versuche, die Salizylsäure wie das Phenol in unlösliche Bromverbindungen überzuführen und in dieser Form aus dem Harn auszuscheiden, misslungen waren, ging er dazu über, die Gewinnung der Säuren aus dem Harn durch Ausschütteln mit Äther und Essigäther zu bewerkstelligen. Da es dem Verfasser insbesondere darauf ankam, eine scharfe Trennung der Salizyl- und Salizylursäure von der Hippursäure herbeizuführen, so glaubte er, es in völlig genügender Weise durch Fällung der in Frage kommenden Säuren mit Bleiessig und Ammoniak tun zu können. Die Ausführung der Bestimmung selbst war nach diesen Grundzügen eine verschiedene.

Der Harn wurde in einem Falle bei alkalischer Reaktion eingedampft, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen, aus dem vom Alkohol befreiten Extrakt die sämtlichen aromatischen Säuren durch Ausschütteln gewonnen und dann erst die weiter unten ausführlich angegebene Trennung von Hippursäure durch Fällen mit Bleiessig und Ammoniak vorgenommen.

In einem andern Versuche wurde der Harn zur Klärung und Entfernung von Schwefelsäure, Schleim und andern Substanzen zunächst mit neutralem Bleiazetat vollständig ausgefällt, der Niederschlag, welcher keine Spur von Salizyl- oder Salizylursäure enthielt, abfiltriert und auf dem Filter so lange ausgewaschen, bis das Filtrat mit Eisenchlorid keine Violettfärbung mehr gab, und dann die Fällung mit Bleiessig und Ammoniak ausgeführt. Dies geschah in der Weise, dass der Harn mit einem grossen Überschuss

[1]) Archiv für experiment. Path. und Pharm. Bd. 26, S. 267 ff. Dr. Ugolino Mosso aus Turin, Quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung der Salizylsäure und Umwandlungsprodukte des Benzylamins aus dem tierischen Organismus.

[2]) Ann. 97, S. 249.

[3]) l. c.

der beiden Reagentien versetzt und dann auf dem Wasserbade erhitzt wurde. Der Niederschlag, der den grössten Teil der gewünschten Säuren enthielt, wurde abfiltriert und im eingeengten Filtrat die Fällung nochmals in oben genannter Weise vorgenommen. Die nunmehr vom Niederschlag ablaufende Flüssigkeit zeigte keine oder nur spurenhafte Salizylsäurereaktion,[1]) und es waren nunmehr sowohl die Salizyl- als auch die Salizylursäure quantitativ entfernt. Die gut ausgewaschenen und vereinigten Bleiniederschläge wurden hierauf mit Schwefelsäure oder Ammoniumkarbonat zerlegt, die Lösung vom Bleisulfat bezw. Bleikarbonat abfiltriert und der betreffende Niederschlag so lange ausgewaschen, bis das Filtrat mit Eisenchlorid keine violette Färbung mehr gab.

Aus der so erhaltenen Lösung schüttelte Mosso nach dem Ansäuern die Salizyl- und Salizylursäure mit Äther und Essigäther oder mit letzterm allein bis zum Verschwinden der Eisenchloridreaktion aus. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde mit Wasser gewaschen und dann in Glasschalen bei gelinder Temperatur verdunstet. Der Rückstand, „ein Gemenge von Kristallen und einer bräunlichen sirupartigen Masse", wurde über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Dann löste Mosso die Substanz in Wasser und verdunstete es auf dem Wasserbade, wodurch nur die leicht flüchtige Salizylsäure, nicht aber auch die Salizylursäure entfernt wurde, die nach dem Trocknen zur Wägung gelangte. Das Auflösen in Wasser, Eindampfen, Trocknen und Wägen wurde so lange fortgesetzt, bis „keine nennenswerte Gewichtsabnahme" mehr stattfand.

Die Differenz zwischen dem ursprünglichen und dem zuletzt gefundenen Gewicht ergab die Menge der unverändert in den Harn übergegangenen Salizylsäure; der nicht flüchtige Anteil wurde als Salizylursäure in Rechnung gebracht. Erschien der letztere dem Verfasser noch zu stark verunreinigt, so löste er ihn in Barytwasser, entfernte die Verunreinigungen zuweilen durch Kochen mit Kohle und schüttelte dann das Filtrat nach dem Ansäuern mit Salzsäure von neuem mit Essigäther aus. Nach dem Verdunsten des letztern hinterblieb trotzdem „eine hellbräunliche sirupartige Masse", die bei den Versuchen am Menschen in der Regel sehr bald vollständig kristallinisch erstarrte, während der aus dem Hundeharn gewonnenen Salizylursäure auch nach längerem Stehen ein sirupartiger Rest anhaftete. Ob diese Masse ein Gemenge von gewöhnlichen Harnbestandteilen und Salizylursäure darstellte oder ob hierin ausserdem noch andere Salizylsäurederivate enthalten waren, lässt Mosso unentschieden. Jedenfalls brachte er das Ganze als Salizylursäure in Rechnung.

[1]) Wie Mosso das Filtrat mit Eisenchlorid auf Salizylsäure prüfte, ist nicht näher angegeben. Tut man es direkt, so fällt infolge überschüssigen Ammoniaks Ferrihydrat in braunen Flocken aus; entfernt man das Ammoniak durch anhaltendes Kochen und versucht dann die Prüfung, so entsteht durch das essigsaure Salz die bekannte blutrote Farbenreaktion, die beim Kochen braunes basisches Ferriazetat abscheidet; daneben fallen reichliche Mengen Bleichlorid. Ich gelangte zum Ziele, indem ich eine Probe des Filtrats vom Ammoniak durch Kochen befreite, mit Salzsäure stark ansäuerte, vom ausfallenden Bleichlorid trennte und mit Äther das Filtrat extrahierte; letzterer wurde dann mit Eisenchlorid auf Salizylsäure geprüft.

So weit Mosso. Er fand in seinen Versuchen an sich selbst 106,7, 96,8 und 98,5%, bei den an Hunden 102,1% der eingeführten Salizylsäure wieder. Über die quantitative Ausschüttelung von Harn darf ich wohl auf die Nachprüfung der Hippursäurebestimmung nach Bunge-Schmiedeberg von Pfeiffer, Bloch und Riecke[1]) hinweisen. Nach dieser Methode wird fragliche Säure durch vielfaches Ausschütteln des alkoholischen Harnextrakts mit Äther und unter Reinigung mit Tierkohle gewonnen. Jedoch enthielt der so dargestellte Rückstand im Mittel nur 71,13% reine Hippursäure; der Rest bestand aus Verunreinigungen, die aber stets als Hippursäure mitgewogen wurden. Weiterhin geben bekanntlich Bleiessig und Ammoniak, die nach Mosso im Überschuss angewandt werden müssen, an und für sich einen Niederschlag von Bleihydrat; ob die Fällung der Salizylsäure und ihrer Derivate durch diese Reagentien eine rein mechanische oder chemische ist, wird in keiner Weise dargetan. Auch die Verdunstung des die in Frage kommenden Säuren enthaltenden Essigäthers bei gelinder Temperatur[2]) nimmt Tage in Anspruch, wobei oft nicht zu verhindern ist, dass die auskristallisierende Substanz mitunter über den Rand der Schale kriecht. Mosso wägt endlich die Verunreinigungen mit, die er ja ausdrücklich als eine „braune sirupartige Masse" bezeichnet; ferner ist es auch sehr subjektiv zu beurteilen, ob der Niederschlag zu sehr verunreinigt sei und einer Umkristallisation etc. noch bedürfe. Bekanntlich ist auch eine derartige Massnahme stets mit Substanzverlust verknüpft, und dass dieser Umstand sich nur auf die zu entfernenden Beimengungen, nicht aber auch auf den zu reinigenden Körper erstrecken sollte, ist doch kaum anzunehmen. Charakteristisch erscheint mir für Mossos Arbeiten folgende Angabe, wenn er auch keine Schlussfolgerung hieraus zieht. Er glaubte 3,3579 g Salizylsäure eingenommen zu haben, findet jedoch im Harn 3,9321 g wieder. Hierzu bemerkt er: „Es muss wohl hier ein Versehen in der Bestimmung der Menge der eingenommenen Salizylsäure, wahrscheinlich um 0,5 g, vorgekommen sein."

Diese eben besprochene Methode ist von St. Bondzyński[3]) wie folgt abgeändert worden, weil die Bleiniederschläge so reichlich (!) waren, dass sie ein quantitatives Arbeiten sehr erschwerten. Dieser Autor machte den Harn alkalisch, dampfte ihn ein, zog den Rückstand mit Alkohol aus, destillierte letztern ab, löste den Extrakt in Wasser und schüttelte dann nach Hinzufügen von Schwefelsäure mit Essigäther aus. Der nach Entfernung des letztern verbleibende Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, mit Salzsäure versetzt und in einem Kölbchen mit Rückflusskühler sechs Stunden gekocht. Diese Lösung wurde dann mit Äther extrahiert und die nach dem Verdunsten der Flüssigkeit verbleibende Substanz in ammonia-

[1]) Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau Bd. II, 2, S. 288.

[2]) Es wäre sehr zweckmässig gewesen, das Temperaturmaximum anzugeben, das nicht überschritten werden darf. Ich liess bei meinen spätern Analysen den Essigäther bei 25—35° C. vendunsten.

[3]) Archiv für experiment. Path. und Pharm. Bd. 38, S. 88. St. Bondzyński, Über das Verhalten einiger Salizylsäureester im Organismus.

kalischem Wasser gelöst und hierin die in Frage kommenden Säuren mit Ammoniak und Bleiessig gefällt. Der Niederschlag wurde gut gewaschen, durch mehrstündiges Erwärmen mit Soda zerlegt, vom Bleikarbonat abfiltriert und so lange gewaschen, bis das ablaufende Wasser keine Salizylsäurereaktion mehr gab. Das eingeengte Filtrat wurde dann mit Schwefelsäure versetzt und noch einmal mit Äther extrahiert. Der nach dem Abdunsten desselben verbleibende Rückstand wurde im Kölbchen bei 50 bis 60° getrocknet und bildete gewogen schliesslich die gesuchte Salizylsäure. Der Verfasser fand nach dieser seiner Methode von der zugesetzten Säure 100,7 % und 109,2 % im Harn und 96,7 bezw. 97,3 % aus Kot wieder. Dass regelmässig im Harn zuviel gefunden wurde, erklärt er infolge der Anwesenheit einer hier stets vorhandenen, mit basischem Bleiazetat fällbaren ätherlöslichen, nicht flüchtigen Säure, die aber im übrigen nicht näher definiert wird.

Auch diese Methode war wie die von Mosso für meinen Zweck, wo es galt, eine Reihe von Bestimmungen auszuführen, praktisch unbrauchbar. Ich unternahm es daher, einen bequemern und einwandfreien Weg zu suchen, indem ich analog der oft erwähnten Hippursäure-Bestimmung die betreffende Säure durch quantitative Destillation von den Harnsalzen trennte[1]) und dann ihre Menge feststellte. Hierzu waren zunächst verschiedene Vorarbeiten nötig, die ich einzeln angebe.

Zur quantitativen Feststellung der Salizylsäure benutzte ich die bekannte Eigenschaft derselben, mit Brom eine unlösliche Verbindung zu geben. Mosso hatte diesen Weg auch versucht, jedoch mit negativem Resultat, da er die Fällung direkt im Harn vornahm.[2]) Ich dagegen setzte auf 100 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit 45 ccm konzentrierte Schwefelsäure und destillierte unter stetem Ersatz des übergehenden Wassers ab, bis dieses mit Bromwasser keine Trübung mehr zeigte. Das ausgefällte, schwach gelblich gefärbte Salizylsäuredibromid wurde auf ein gewogenes Filter gebracht, getrocknet und durch Wägung bestimmt. In dieser Weise wurden von 0,5 g angewandter Salizylsäure 0,5089 g wiedergefunden. Von Herrn Dr. Rümpler freundlichst darauf aufmerksam gemacht, dass es vielleicht möglich wäre, die ausgefällte Säure zu titrieren, was ja eine grosse Zeitersparnis bedeutet, versuchte ich diesen Weg. Den abfiltrierten Niederschlag liess ich an der Luft abtrocknen, brachte ihn samt dem Filtrierpapier in einen Erlenmeyer-Kolben, löste ihn event. unter Erwärmen in säurefreiem[3]) Alkohol und titrierte direkt mit Lauge unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator. Es wurden so von 0,5 g angewandter Säure 0,5116 bezw. 0,5038 g wiedergefunden; infolge dieses günstigen Ergebnisses wurde bei meinen spätern Untersuchungen stets die Titration angewandt. Auf einige Vorsichtsmassregeln hierbei komme ich im folgenden Abschnitt zu sprechen.

[1]) St. Bondzyński (l. c.) hatte dieses Verfahren auch versucht, aber als zu zeitraubend wieder fallen gelassen.

[2]) S. 15.

[3]) Da der Alkohol gewöhnlich sauer reagiert, so tut man gut, ihn zu diesem Zwecke stets über Kali zu destillieren.

Zur Trennung der Salizyl- und Hippursäure konnten zwei Wege eingeschlagen werden: Entweder säuert man die Flüssigkeit mit den in Betracht kommenden Substanzen nur ganz schwach an und destilliert die Salizylsäure ab, spaltet dann die im Kolben zurückgebliebene Hippursäure durch starkes Ansäuern und bestimmt die übergehende Benzoesäure, oder man säuert sofort stark an, destilliert die Salizylsäure und die aus der Hippursäure stammende Benzoesäure ab und trennt sie dann. In beiden Fällen gelangt man zum Ziel.

Nach dem zuerst skizzierten Wege verfährt man folgendermassen: In einen Siedekolben von 700 ccm wird die auf Salizyl- und Hippursäure zu untersuchende Substanz gebracht. Hierzu fügt man 130 ccm Wasser, 6 ccm konzentrierte Schwefelsäure und zur Erhöhung des Siedepunktes[1]) 25 g Kaliumsulfat und destilliert. Nach Gewinnung von 30 ccm werden durch eine Hahnpipette 30 ccm Wasser hinzugelassen, so dass die im Kolben befindliche Flüssigkeitsmenge stets 100 ccm beträgt, bei welcher Konzentration sich die Hippursäure nach meinen Versuchen nicht spaltet. Die Destillation wird dann in der angegebenen Weise fortgesetzt, bis eine im Reagenzglas aufgefangene Probe mit einem Tropfen gesättigten Bromwassers keine Trübung von Salizylsäuredibromid erkennen lässt, welche Probe man andernfalls natürlich zur Hauptmasse zurückgiesst. Im übergegangenen Destillat fällt man die Salizylsäure als Dibromid, indem man unter stetem Rühren tropfenweise so viel Bromwasser zufliessen lässt, bis die Flüssigkeit gerade anfängt sich schwach gelblich zu färben. Den entstandenen weissen[2]) Niederschlag filtriert man ab und wäscht ihn gut aus; das Filtrat verversetzt man jetzt noch einmal mit einem ganz geringen Überschuss von Bromwasser, kenntlich an der gelben Färbung, schüttelt gut durch, lässt den etwa gebildeten Niederschlag absitzen und filtriert durch ein zweites Filter. Hat man im Anfang zuviel Bromwasser zugesetzt und entsteht ein schwefelgelbes Dibromid, so enthält dasselbe überschüssiges freies Brom, welches ich in keiner Weise, z. B. durch Kochen oder Durchleiten von Wasserstoff, entfernen konnte. Dieses freie Halogen wirkt auf die kalte Titrierlauge unter Bildung von unterbromigsaurem Salz ein, so dass dann immer zuviel Salizylsäure gefunden wird. Die vereinigten Niederschläge löst und titriert man wie oben. Hierbei ist zu bemerken, dass Phenolphthalein, welches als Indikator dient, durch freies, dem Niederschlage in Spuren mechanisch beigemengtes oder von ihm eingeschlossenes Brom zerstört wird und nicht mehr durch überschüssiges Alkali gerötet wird. Um diese störende Menge freien Halogens möglichst zu reduzieren, wende ich auch das zweimalige Ausfällen an; jedoch ist auch bei dieser Vorsichtsmassregel bisweilen noch so viel im Niederschlage vorhanden, dass die in der gewöhnlichen Indikator-Lösung (1 : 1000) vorhandene Menge Phenolphthaleins zerstört wird. Deshalb ist es unter allen Umständen zweckmässig, von vornherein der zu titrierenden alkoholischen Lösung von Dibromsalizylsäure eine kleine Messerspitze von festem Phenolphthalein hinzuzufügen. — Die

[1]) Vergl. Anm. 2 auf S. 5.

[2]) S. w. u.

nach dem Abdestillieren der Salizylsäure im Kolben zurückbleibende Flüssigkeit wird mit 40 ccm konzentrierter Schwefelsäure beschickt und die darin enthaltene Hippursäure nach der öfter zitierten Methode bestimmt.

In der angegebenen Weise wurden 0,3 g Salizylsäure und 0,6 g Hippursäure behandelt. Durch eine Destillation von 1000—1500 ccm Wasser wurde die Salizylsäure und dann die Hippursäure bestimmt mit folgendem Erfolge:

a) 0,28469 g Salizylsäure und 0,62834 g Hippursäure.
b) 0,30346 „ „ „ 0,59151 „ „

Es wurden also wiedergefunden 94,89 bezw. 101,12% Salizylsäure und 104,36 bezw. 98,59% Hippursäure. Diese Zahlen sind nicht so genau wie bei der erwähnten Hippursäurebestimmung; da es sich aber hier um zwei Körper handelt und man sich genötigt sieht, mit grossen Flüssigkeitsmengen zu arbeiten, so ist auch nicht zu verwundern, dass die Fehlergrenze infolgedessen grösser ist.

Bessere Resultate erzielte ich bei dem zweiten oben kurz angedeuteten Verfahren, das ich auch bei meinen spätern Untersuchungen ausschliesslich angewandt habe. Hiernach wurden die in Frage kommenden Säuren mit 100 ccm Wasser in einen Kolben von 700 ccm Inhalt gebracht, 45 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt und destilliert. Nach Gewinnung von 50 ccm Destillat lässt man durch eine Hahnpipette 30 ccm Wasser in den Kolben hinzutreten und destilliert weitere 30 ccm ab, so dass im Kolben stets 100 ccm Flüssigkeit vorhanden sind. Diesen letzten Prozess wiederholt man so lange, bis eine Probe des übergehenden Wassers mit Brom keine Trübung erkennen lässt. Die Salizylsäure fällt man im Destillat wie oben, filtriert und titriert. Da Spuren überschüssigen Broms in der Siedehitze auf Benzoesäure einwirken könnten, entfernt man es aus dem Filtrat durch Wasserstoff, den man hierin durch eine Messerspitze Zinkstaub und Schwefelsäure erzeugt, dann bringt man einen Teil in einen Kolben, fügt 45 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzu und destilliert sämtliche Benzoesäure ab, indem man allmählich den Rest des Filtrats durch eine Hahnpipette nachfüllt. Das erhaltene Destillat wird dann schwach alkalisch gemacht, eingedampft und die Benzoesäure nach der oben zitierten Methode bestimmt. In dieser Weise wurden wiedergefunden von 0,5 g Salizylsäure und 0,5 g Benzoesäure:

a) 0,5116 g Salizylsäure und 0,4744 g Benzoesäure.
b) 0,5038 „ „ „ 0,4539 „ „

Hierbei stimmen die Zahlen für die Salizylsäure (102,3 und 100,7%) besser überein wie bei der vorhergehenden Methode, dagegen lässt sich ein grösserer Verlust von Benzoesäure (94,88 und 90,78% wiedergefunden) nicht vermeiden, da zu dem Filtrat der ausgefällten Dibromsalizylsäure noch das Waschwasser hinzukommt und in dieser grossen Flüssigkeitsmenge die zweite in Frage kommende Säure bestimmt werden muss.

So weit war die Aufgabe gelöst, die Gesamtbenzoesäure und Gesamtsalizylsäure zu bestimmen. Die erstere kommt im Harn der Pflanzenfresser

als solche normalerweise nicht vor,[1]) sondern nur gepaart mit Glykokoll als Hippursäure, die letztere dagegen sowohl frei als auch in Verbindung mit andern organischen Körpern.

Um diese gebundene Salizylsäure zu bestimmen, wollte ich zunächst das Verhalten der Salizylursäure beim Kochen mit Säuren prüfen. Da Merck-Darmstadt und Grübler-Leipzig ihre Darstellung nicht übernahmen, versuchte ich selbst, sie nach den Angaben von C. Bertagnini[2]) zu gewinnen. Von zwei rheumatisch erkrankten Personen, die als Medikament täglich 6 g Salizylsäure in Form des Natriumsalzes erhielten, liess ich, 8 Stunden nach der ersten Einnahme angefangen, ca. 5 l Harn[3]) sammeln, machte ihn neutral, dampfte ihn auf ca. 1 l ein und schüttelte ihn nach dem Ansäuern mit Salzsäure sechsmal mit je 200 ccm Äther aus. Dieser wurde abdestilliert und der Rückstand erstarrte im Eisschrank zu einer kristallinischen Masse. Letztere wurde von der anhaftenden sirupartigen Flüssigkeit abgesaugt, mit Tierkohle gereinigt, und nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser und Trocknen über Schwefelsäure resultierte 1,5 g eines fast farblosen Kristallgemisches, das Salizyl- und Salizylursäure enthalten musste. Die von Bertagnini angegebene Methode der Reindarstellung von Salizylursäure durch Absublimation der Salizylsäure in einem Luftstrom bei 140 bis 150° C. wandte ich nicht an, da es mir nur darauf ankam, festzustellen, unter welchen Bedingungen sich die Oxyhippursäure zersetzte. Deshalb brachte ich das erhaltene Kristallgemisch in einen 700 ccm-Kolben, fügte 130 ccm H_2O und 25 g Kaliumsulfat hinzu und destillierte, indem ich für das übergehende Wasser stets die gleiche Menge durch eine Hahnpipette ersetzte, so dass der Kolbeninhalt stets 100 ccm betrug. Nachdem so ca. 8 l Destillat gewonnen waren, konnte in der weiterhin übergehenden Flüssigkeit mit Bromwasser Salizylsäure nicht mehr nachgewiesen werden; sie war also quantitativ entfernt. Jetzt wurde die weiterhin übergehende Flüssigkeit nicht mehr durch blosses Wasser ersetzt, sondern durch solches, das in 30 ccm 0,13 ccm konzentrierte Schwefelsäure enthielt, und das Destillat auf Salizylsäure geprüft, die nur von der sich spaltenden Salizylursäure herrühren konnte. Als das dritte Mal das angesäuerte Quantum Wasser hinzugefügt wurde, der Kolben also 100 ccm Wasser, 25 g Kaliumsulfat und ($3 \times 0{,}13 =$) 0,39 ccm konzentrierte Schwefelsäure enthielt, trat bereits im Destillat die charakteristische Salizylsäurereaktion ein. Um also in einem Gemenge von Salizylsäure und Salizylursäure beide quantitativ zu bestimmen, müsste man wie oben einen Kolben beschicken, ganz schwach sauer machen (Prüfung mit Kongorotpapier), zuerst die freie Salizylsäure abdestillieren und dann durch stärkeres Ansäuern die gebundene Salizylsäure spalten und ebenfalls abdestillieren. Die quantitative Bestimmung der je-

[1]) Mitteilungen der landw. Institute der Universität Breslau Bd. II, 4, S. 699.

[2]) Ann. 97, S. 248. C. Bertagnini, Über das Verhalten einiger Säuren im tierischen Organismus.

[3]) Ich erhielt ihn durch die Liebenswürdigkeit des Sanitätsrats Herrn Dr. R. Croce, Oberarzt am Kloster der barmh. Brüder zu Breslau, dem ich hiermit meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

weiligen Menge geschieht als Dibromsalz. Da diese Methode sehr langwierig und deshalb praktisch unbrauchbar ist, denn in der ganz schwach sauren Lösung führen 500 ccm Destillat nur ungefähr 0,1 g Salizylsäure mit sich, — so versuchte ich, ob ich nach Mosso eine Trennung der gebundenen und freien Salizylsäure bewirken könnte. Hierzu unterwarf ich den in Betracht kommenden Teil jener Arbeit einer Nachprüfung.

Zunächst orientierte ich mich über die Flüchtigkeit der Salizylsäure mit Wasserdämpfen. Dazu wog ich in eine Platinschale 1,0 g reine Salizylsäure, fügte 50 ccm Wasser hinzu, dampfte auf dem Wasserbade ein und trocknete über Schwefelsäure. Dieses wurde mehrfach wiederholt mit folgendem Erfolg:

Platinschale + 1,0 g Salizylsäure wog									39,6015 g.
Nach dem Abdampfen von	500	ccm	Wasser	wog	sie				38,8300 „
„ „ „ „	800	„	„	„	„				38,6230 „
„ „ „ „	850	„	„	„	„				38,6170 „
„ „ „ „	1000	„	„	„	„				38,6135 „
„ „ „ „	1100	„	„	„	„				38,6025 „

Ein zweites Mal wurden 0,3 g Salizylsäure, in der nämlichen Weise behandelt, durch sechsmaliges Abdampfen von je 50 ccm Wasser verflüchtigt.[1]) Es ergibt sich also aus diesen beiden Versuchen, dass Salizylsäure mit Wasserdämpfen quantitativ entfernt werden kann.

Nunmehr schritt ich zur Prüfung der Frage, ob die Verflüchtigung der genannten Säure auch aus Harnextrakt sich in gleicher Weise vollziehe. Dazu behandelte ich normalen menschlichen Harn, der keine Spur von Salizylsäure enthielt, nach Mossos Vorschrift wie einen solchen, der nach Einnahme von Salizylsäure erhalten war. Auch hier erhielt ich aus oben angegebenen Gründen mit Bleiessig und Ammoniak starke Niederschläge, die ich mit Ammoniumkarbonat zerlegte, mit Salzsäure versetzte und dann mit Essigäther ausschüttelte. Diesem so erhaltenen Extrakt setzte ich dann 0,3 g reine Salizylsäure zu und nach Verdunsten des Lösungsmittels in Glasschalen bei 25—35° blieb ein Rückstand von Kristallen und einer sirupartigen Masse. Dieses Gemisch trocknete ich über konzentrierter Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz und behandelte es dann wie oben auf dem Wasserbade. Der nicht flüchtige Rückstand wurde in einen Kolben gebracht und die darin enthaltene Salizylsäure bestimmt. Wie aus den unten angegebenen Zahlen ersichtlich, wurde die dem Harnextrakt hinzugesetzte Salizylsäure mit Wasserdämpfen völlig entfernt; gleichzeitig ist aber auch ein Teil des Harnrückstandes selbst mitverflüchtigt, indem in beiden Fällen die Schale mehr an Gewicht verlor, als der hinzugesetzten Salizylsäure-Menge entsprach. Mosso hatte also als Salizylsäure gewogen: Salizylsäure + mit Wasserdämpfen flüchtige Harnbestandteile, als Salizylursäure: gebundene Salizylsäure + nicht flüchtige Harnbestandteile. Meine Zahlen bei dem oben beschriebenen Versuch waren folgende:

[1]) Da die mit Salizylsäure gesättigten Dämpfe, die einen eigentümlich süsslichen Geruch haben, Kopfschmerzen erzeugen, tut man gut, das Verflüchtigen derselben unter dem Abzuge vorzunehmen.

Schale + Harnextrakt + 0,3 g zugesetzter Salizylsäure . .	65,5430 g	64,3800 g
Schale nach Behandlung mit Wasserdämpfen	65,0512 „	63,8685 „
Gewichtsdifferenz:	0,4918 g	0,5115 g.
An Harnextrakt ist also nach Abzug der zugesetzten 0,3 g Salizylsäure verflüchtigt	0,1918 g	0,2115 g.
Im Rückstand enthaltene Salizylsäure	0,01644 „	Spuren.

Hieraus geht hervor, dass auch aus Harnextrakt die Salizylsäure mit Wasserdämpfen verflüchtigt werden kann. Wenn bei der ersten Schale im Rückständ noch 0,01644 g Salizylsäure gefunden wurden, so lag dies daran, dass diese noch nicht vollständig gewichtskonstant war; die Differenz zwischen den beiden letzten Wägungen betrug noch 0,0196 g. Ich glaubte jedoch gegen Mossos Vorschrift nicht verstossen zu haben, da das Auflösen in Wasser, Eindampfen, Trocknen und Wägen so lange fortgesetzt werden soll, bis „keine nennenswerte Gewichtsabnahme“ (!) mehr eintritt. Die andere Schale brachte ich zur völligen Gewichtskonstanz, wobei ich dann auch im Destillat des Rückstandes nur eine opalisierende Trübung mit Bromwasser erhielt.

Nach diesen Vorarbeiten ging ich dazu über, in dem nach Bertagnini erhaltenen Gemenge von Salizyl- und Salizylursäure diese beiden Bestandteile nach Mosso zu bestimmen. 0,4 g des Kristallgemisches, das wie oben (S. 21) dargestellt war, wurden in einer Platinschale mit 50 ccm Wasser übergossen, dieses auf dem Wasserbade verdampft und dieser Prozess bis zur Gewichtskonstanz der Schale wiederholt; es hatten sich hierbei von der angewandten Menge 0,3880 g verflüchtigt, der Rest von 0,0120 g musste nach Mosso als Salizylursäure angesehen werden. Ich brachte denselben in einen 700 ccm-Kolben, füllte auf 100 ccm auf, setzte 50 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzu und destillierte unter stetem Ersatz des übergehenden Wassers in der mehrfach beschriebenen Weise. Etwaige Salizylursäure musste hierdurch in Salizylsäure und Glykokoll gespalten werden und die erstere ins Destillat übergehen. Doch dieses zeigte mit Brom keine Spur eines Niederschlages. Den nämlichen Versuch wiederholte ich dann mit 1,1275 g des obigen Kristallgemisches; 1,0997 g hiervon waren mit Wasserdämpfen flüchtig, der Rückstand von 0,0278 wurde in einen Kolben gebracht und wie vorher behandelt. Das Destillat zeigte jetzt eine opalisierende Trübung mit Bromwasser, bei der kein absolut sicherer qualitativer Nachweis, geschweige denn eine quantitative Bestimmung möglich war. Es hat sich demzufolge in dem von mir dargestellten Kristallgemisch keine Salizylursäure oder höchstens unbestimmbare Spuren befunden. Da dieses Resultat mit dem früheren (vergl. S. 21) nicht übereinstimmte, so blieb mir jetzt noch übrig, Mossos Versuch vollständig zu wiederholen, gleichzeitig dabei seine Methode und die meinige einer Prüfung und einem Vergleich zu unterziehen und allenfalls beide zu kombinieren. Zu diesem Zweck nahm ich nachmittags um 3 und um 7 Uhr und am folgenden Tage vormittags um 7 und um 11 Uhr, nachmittags um 3 und um 7 Uhr je ein Gramm Salizylsäure in Form des Natriumsalzes[1]) (= 1,16 g salizylsaures

[1]) Ich überzeugte mich von der Reinheit des eingenommenen Präparats, indem ich die hierin enthaltene Salizylsäure als Dibromsalz fällte und titrierte; 0,3 g entsprachen

Natrium), insgesamt also 6 g ein — die doppelte Menge, die Mosso zu sich genommen. Mein Befinden war während dieses Autoversuchs ein entsprechend normales, erst am Nachmittage des zweiten Tages machten sich etwas Kopfschmerzen, Ohrensausen und eine diuretische Wirkung bemerkbar. Der Harn wurde quantitativ aufgesammelt, bis sich mit Eisenchlorid keine Salizylsäure mehr nachweisen liess, was 42 Stunden nach der letzten Dosis eintrat. Dann machte ich den Harn ganz schwach alkalisch, kochte ihn auf, filtrierte von den ausgeschiedenen Phosphaten ab, wusch den Filterrückstand gut aus und füllte auf 2000 ccm auf; hiervon wurden aliquote Teile zur Analyse verwandt.

In je zwei Portionen à 100 ccm bestimmte ich nach meiner oben angegebenen Methode die Gesamtsalizylsäure. Es wurden wiedergefunden 0,28557 bezw. 0,27530 g, das gibt auf die gesamte Harnmenge umgerechnet 5,7115 bezw. 5,5060 g oder 95 bezw. 91,7 % der eingenommenen Menge.

Da bei Mosso „die Ausführung der Bestimmung . . . eine verschiedene bei den einzelnen Versuchen" war, so gebe ich hier genau wieder, wie ich nach seiner Anweisung gearbeitet habe. 200 ccm obigen Harns wurden schwach alkalisch zur Trockne auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand so lange mit heissem Alkohol extrahiert, bis eine Probe hiervon beim Schütteln mit Eisenchlorid keine Violettfärbung erkennen liess. Der nach dem Abdestillieren des Alkohols verbleibende Rückstand wurde mit siedendem Wasser aufgenommen, mit Salzsäure versetzt und siebenmal mit je 50 ccm Essigäther ausgeschüttelt. Dieser Auszug wurde mit Baryumkarbonat neutralisiert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Hierin fällte ich die Salizylsäure und ihre Derivate sechsmal mit Bleiessig und Ammoniak auf dem Wasserbade, bis das vom Niederschlage[1]) ablaufende Filtrat mit Eisenchlorid[2]) keine Reaktion zeigte. Nach Mosso hätte ich mich mit einer zweimaligen Fällung begnügen können. Die vereinigten Niederschläge zerlegte ich dann mit Ammoniumkarbonat, filtrierte vom ausgeschiedenen kohlensauren Blei ab, wusch es genügend aus und schüttelte das Filtrat nach Ansäuern mit Salzsäure mit Essigäther bis zur völligen Erschöpfung der Salizylsäure aus. Letztern füllte ich sodann in eine Glasschale und liess ihn bei 25—35° C. verdunsten. Auch ich erhielt wie Mosso einen Kristallbrei und eine sirupartige Masse. Im Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet, erhielt ich folgende Werte:

Schalengewicht	44,4980 g	43,7010 g
Schalengewicht + Verdunstungsrückstand	45,2950 „	44,5715 „
Salizyl- + Salizylursäure	0,7970 g	0,8705 g.

hierbei 0,267 g Salizylsäure, 1,16 g also 1,032 g. Das verwendete Salz konnte ich also als rein ansehen.

[1]) Ich erhielt so einen starken Niederschlag, der bei der ersten Fällung schmutzigbraun, später rein weiss war. Dieser Umstand scheint mir darauf hinzudeuten, dass Bleihydrat allein ausfiel, welches die im Harn vorhandenen Verunreinigungen, darunter auch Salizylsäure, mechanisch mit sich riss.

[2]) Vergl. S. 16, Anm. 1.

In diesem Rückstand verflüchtigte ich auf dem Wasserbade die Salizylsäure mit folgendem Erfolg:

Schale + Verdunstungsrückstand	45,2950 g	44,5715 g
Schale nach Verflüchtigung der Salizylsäure . . .	45,0425 „	44,2850 „
Als Salizylsäure verflüchtigt	0,2525 g	0,2865 g.
Vom Ausschüttlungsrückstande	31,7 %[1])	32,9 %[1]).
Als Salizylursäure blieb also	0,5445 g	0,5840 g.

In diesem nach Mosso als Salizylursäure anzusehenden Rückstand, von dem ich nicht wusste, ob er noch „zu stark verunreinigt" sei und infolgedessen noch einer Umkristallisation unter Zusatz von Tierkohle bedürfe, bestimmte ich die Salizylsäure durch Überdestillieren, Fällen mit Bromwasser und Titrieren und fand hierin 0,17924 bezw. 0,21562 g Salizylsäure. Wenn nun der verflüchtigte Anteil ganz aus reiner Salizylsäure bestanden hätte und ich die im Rückstand bestimmte Salizylsäure hinzuaddiere, so finde ich 0,43174 bezw. 0,50212 g, im Gesamtharn also 4,3174 bezw. 5,0212 g, d. h. 71,95 bezw. 83,7 % der in den Organismus eingeführten Menge, wie ja auch (vergl. S. 17) bei der Ausschüttlung der Hippursäure nach Bunge-Schmiedeberg im Harnextrakt im Mittel nur 71,13 % reine Säure gefunden wurden.

Nach diesen Vorversuchen glaubte ich drei Harnbestandteile, die bei einer Zulage von Methyläthersalizylsäure zum Grundfutter zu erwarten waren, bestimmen zu können: Hippursäure bezw. die daraus abgespaltene Benzoesäure, die freie bezw. nur an Alkali gebundene Salizylsäure und schliesslich die anderweitig gebundene und mit Wasserdämpfen nicht flüchtige Salizylsäure. Zunächst ermittelte ich die Gesamtsalizylsäure und Hippursäure, wie oben angegeben. Dann verfahre ich ähnlich wie Mosso, indem ich zweimal einen aliquoten Teil des alkalischen Harns (in diesem Falle 150 ccm) zur Trockne verdampfe, mit heissem Alkohol extrahiere, diesen abdestilliere und den Rückstand, in Wasser gelöst und mit Salzsäure versetzt, mit Essigäther so lange ausschüttele, bis eine Probe hiervon mit Eisenchlorid nicht mehr violett gefärbt wird. Das so erhaltene Produkt bringe ich in eine flache Schale, lasse das Lösungsmittel bei 25—35° C. verdunsten und trockne den Rückstand im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz. Indem ich nun von der Annahme ausgehe, dass bei der oben beschriebenen Behandlung freie wie gebundene Salizylsäure in gleicher Menge extrahiert werde,[2]) so bestimme ich im Verdunstungsrückstand der einen Schale die Gesamtsalizylsäure, in der Parallelanalyse verjage ich die freie Salizylsäure mit Wasserdämpfen bis zur Gewichtskonstanz und bestimme dann im Rückstand, d. h. in dem mit Wasserdämpfen nicht verflüchtbaren Anteil, ebenfalls die in Frage kommende Säure. Aus der Gesamtsalizylsäure und aus dem Verhältnis der ausschüttelbaren Gesamtsalizylsäure zu der hierin nicht verflüchtbaren Menge kann ich dann die letztere auf den Gesamtharn umrechnen.

[1]) Mosso fand bei seinen Versuchen im Ausschüttlungsrückstand an mit Wasserdämpfen verflüchtbarer Salizylsäure 7—15 % beim Menschen, 51 % beim Hunde.

[2]) Wenn auch diese Annahme eine willkürliche ist, so hat sie doch einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit.

Obwohl über die Wirkung der Methyläthersalizylsäure auf den Organismus nichts bekannt war, so glaubte ich doch nach den Erfahrungen über das Verhalten der Salizylsäure,[1]) 5 bezw. 10 g des in Frage kommenden Körpers ohne Schaden einem Hammel verabreichen zu können, was auch tatsächlich der Fall war. Dieser Versuch schloss sich dem mit Vanillinsäure direkt an bei einer Zwischenfütterung von 6 Tagen mit der in beiden Fällen gleichen Grundration. Auffallend war hierbei die starke Verminderung der Hippursäure bezw. Benzoesäure.[2]) Eine Erklärung hierfür glaube ich in der antiseptischen Wirkung der Salizylsäure gefunden zu haben, wodurch die Eiweissfäulnis im Darm verhindert, die Wirkung der Verdauungsenzyme gehemmt und die Bakterientätigkeit aufgehoben wird, welch letztere ja im Pansen des Wiederkäuers durch Gärung eine Aufschliessung namentlich der Rohfaser bewirkt.

Die Methyläthersalizylsäure wurde im Organismus gespalten und die ausgeschiedene Salizylsäure stieg, wie aus der unten angeführten Tabelle ersichtlich, der erhöhten Zulage des obigen Körpers entsprechend, blieb aber dann vom 2.–4. Tage nach der letzten Gabe konstant, ja erfuhr sogar am 4. Tage noch eine geringe Steigerung. Dieser Umstand gab der Vermutung Raum, dass auch andere nicht salizylsäurehaltige Bestandteile mit Bromwasser gefällt sein könnten, und ein qualitativer Versuch mit einem Harn, der von der Vorfütterung stammte, bestätigte es.[3]) Infolgedessen war es nötig, bei den direkt gefundenen Zahlen eine Korrektur anzubringen. Hammel II, der zu obigem Versuch gedient hatte, wurde deshalb 14 Tage nach der letzten Gabe von Methyläthersalizylsäure in den Zwangsstall gebracht und sein Harn nach 6tägiger Vorfütterung unter Beibehaltung der früheren Grundration von 700 g Luzernehen, 100 g Weizenschalen und 10 g Kochsalz 7 Tage lang auf mit Brom fällbare Bestandteile untersucht. Es fand sich im Destillat ein ziemlich starker Niederschlag, der pro Tag im Mittel 1,7325 g Salizylsäure[4]) bei einem wahrscheinlichen Fehler von $\pm$ 0,03427 g entsprach. Diese Menge musste natürlich von den vorher direkt gefundenen Zahlen in Abzug gebracht werden und so ergab sich, dass von den eingeführten 30 g Methyläthersalizylsäure 9,05883 g als Salizylsäure wiedergefunden wurden; es sind dies 33,25 % der theoretisch möglichen Menge, bei der Oxydation mit Permanganat waren es 40,18 bezw. 45,59 %.

[1]) Eugen Fröhner, Lehrbuch der Arzneimittellehre für Tierärzte. Stuttgart 1903, 6. Aufl., S. 30. Ein 9 Jahre altes Pferd zeigte bei 300 g Salizylsäure, in drei Tagen eingenommen, nur längere Verdauungsstörungen auf Grund lokaler Anätzung der Maulhöhle und Magenschleimhäute, sonst keine Vergiftungserscheinungen. Ein 32 kg schweres Schaf blieb nach 50 g Salizylsäure, in drei Tagen verabreicht, ganz gesund. — Dagegen sind Fleischfresser und namentlich Hunde ziemlich wenig widerstandsfähig. Bei 1 g Salizylsäure pro 5 kg Körpergewicht traten Vergiftungserscheinungen ein.

[2]) Tabelle für die bei der Zulage von Methyläthersalizylsäure erhaltenen Zahlen siehe S. 28.

[3]) Welcher Art die Bestandteile waren, die mit Bromwasser zur Fällung gelangten, habe ich nicht untersucht. — Das Destillat normalen menschlichen Harns zeigte diese Erscheinung nicht.

[4]) Tabelle der täglich erhaltenen Zahlen siehe S. 28.

Bei Bestimmung des Verhältnisses der freien und gebundenen Salizylsäure ging auch ein Teil jener unbekannten, nicht salizylsäurehaltigen Substanzen in das Ausschüttlungsprodukt über.[1]) Letztere wurden mit Wasserdämpfen verflüchtigt, was daraus hervorgeht, dass am 3. und 4. Tage nach der letzten Gabe von Methyläthersalizylsäure in dem mit Wasserdämpfen behandelten Rückstand keine Spur von Salizylsäure nachzuweisen war. Da die Menge aus dem Grundfutter stammender, nicht salizylsäurehaltiger, aber mit Brom fällbarer Bestandteile bei derselben Ration konstant war, so stieg natürlich im Verhältnis der erhöhten Zulagen von Methyläthersalizylsäure auch der prozentische Gehalt der gebundenen zu den überhaupt mit Brom gefällten Substanzen. Aus diesem Grunde ist es auch in diesem Falle unmöglich, die Menge der gebundenen Salizylsäure absolut bestimmen zu können; doch kann man beim Vergleich der Gesamtsalizylsäuremenge mit der gebundenen leicht erkennen, dass weitaus der grösste Teil in Form der letztern zur Ausscheidung gelangt ist.

Wirkung der Vanillinsäure auf die Benzoesäure im Harn auf Hammel I bei einem Grundfutter von 700 g Luzerneheu + 100 g Weizenschalen pro Tag.

	Benzoesäure in Gramm:	
G + Ø	2,105 00	Im Mittel 2,31623 g Benzoesäure pro Tag; wahrscheinlicher Fehler ± 0,2548 g.
do.	2,159 50	
do.	2,204 30	
do.	2,364 00	
do.	2,521 75	
do.	2,562 85	
G + 5 g Vanillinsäure	2,676 55	1 g Vanillinsäure hat die Benzoesäure im Harn erhöht um 0,1405 g.
do.	2,802 05	
G + 10 g Vanillinsäure	3,379 95	
do.	2,912 20	
G + Ø	4,025 60	

Wirkung der Vanillinsäure und Methyläthersalizylsäure auf die betreffenden Harnausscheidungen bei einem Grundfutter von 700 g Luzerneheu, 100 g Weizenschalen und 10 g Kochsalz pro Tag, beobachtet an Hammel II.

G + Ø	3,103 10	Im Mittel 3,0007 g Benzoesäure pro Tag; wahrscheinlicher Fehler ± 0,0363.
do.	3,069 50	
do.	2,935 55	
do.	3,051 35	
do.	2,849 25	
do.	2,994 78	
G + 5 g Vanillinsäure	3,109 75	1 g Vanillinsäure hat die Benzoesäure im Harn erhöht um 0,12266 g.
do.	3,336 54	
G + 10 g Vanillinsäure	3,893 00	
do.	4,786 70	
G + Ø	3,211 70	
do.	3,342 45	

[1]) Die betreffende Tabelle siehe S. 28.

	Benzoesäure in Gramm:		
G + 0	3,026 38		
do.	2,962 78		
do.	3,133 08		
do.	3,049 35		
		Mit Brom fällbare Bestandteile im Harn, titriert und auf Salizylsäure berechnet	Gesamtsalizylsäure im Harn[1])
		g	g
G + 5 g Methyläthersalizylsäure	2,975 00	2,298 82	0,566 37
do.	1,712 67	2,747 09	1,014 64
G + 10 g Methyläthersalizylsäure	1,667 14	4,170 30	2,437 85
do.	1,151 10	5,140 14	3,407 69
G + 0	2,709 57	2,896 84	1,164 39
do.	2,289 97	1,890 13	0,158 68
do.	2,302 07	1,753 18	0,020 73
do.	2,918 47	2,020 93	0,288 48

Mit Bromwasser fällbare Bestandteile im normalen Harndestillat bei Hammel II unter Verabreichung des obigen Grundfutters von 700 g Luzerneheu, 100 g Weizenschalen und 10 g Kochsalz, titriert und auf Salizylsäure berechnet; Vorfütterung 6 Tage.

	Salizylsäure in Gramm:	
G + 0	1,873 51	Im Mittel 1,73245 g; wahrscheinlicher Fehler + 0,034 27 g.
do.	1,568 27	
do.	1,660 36	
do.	1,849 05	
do.	1,568 12	
do.	1,795 44	
do.	1,812 40	

Verdunstungsrückstand des Harns von Hammel II bei obigem Grundfutter, gewonnen nach Seite 25, nebst den hierin direkt und nach Behandlung mit Wasserdämpfen durch Brom fällbaren Bestandteilen, titriert und auf Salizylsäure berechnet.

Fütterung:	Verdunstungsrückstand in Portion I	Hierin mit Bromwasser gefällt, titriert u. auf Salizyls. berechnet	Verdunstungsrückstand in Portion II	Mit Wasserdämpfen flüchtig in Portion II	Im nicht flüchtigen Anteil mit Bromwasser gefällt, auf Salizyls. berechnet	Nicht flüchtig waren von den mit Brom gefällten Bestandteilen
	g	g	g	g	g	%
G + 5 g Methyläthersalizyls.	10,794	1,906 96	10,426	6,745	0,456 25	23,93
do.	11,011	2,600 40	11,889	6,775	0,646 16	21,0
G + 10 g Methyläthersalizyls.	17,893	3,561 76	19,107	9,885	1,447 60	40,64
do.	19,459	5,200 80	18,645	8,967	3,656 95	70,3
G + 0	14,162	2,496 00	12,863	9,504	0,362 48	15,0
do.	9,466	0,504 32	9,107	5,184	0,012 61	2,5
do.	7,362	0,441 28	8,061	5,395	—	—
do.	8,047	0,472 80	7,792	5,002	—	—

[1]) D. h. nach Abzug der im normalen Harn befindlichen und mit Brom fällbaren Bestandteile, vergl. die nächste Tabelle.

Die hauptsächlichsten Ergebnisse meiner vorliegenden Arbeit lassen sich in folgenden Sätzen kurz zusammenfassen:

1. Die bereits früher festgestellte Bildung von Benzoesäure aus Koniferin bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat findet ihre Bestätigung.
2. Durch Zusammenwirken der OH- und OCH_3-Gruppe in Ortho-Stellung tritt bei aromatischen Körpern trotz Oxydation mit Permanganat in alkalischer Lösung eine Reduktion und Abspaltung der O . CH_3-Gruppe ein, und so liefern Koniferin, Koniferylalkohol und Vanillinsäure, nicht aber Methyläthersalizylsäure bei diesem Prozess Benzoesäure.
3. Das soeben gekennzeichnete Verhalten findet auch im tierischen Organismus statt und bildet dadurch einen Faktor bei der Bildung von Hippursäure.
4. Die Methode der Salizylsäurebestimmung durch Überdestillieren derselben, Fällung als Dibromid und Titration liefert brauchbare Resultate.
5. Die Trennung der Salizylsäure von Benzoesäure bezw. Hippursäure ist auf Grund ihres verschiedenen Verhaltens gegen Bromwasser durchführbar und liefert brauchbare Resultate.
6. Bei Zulage von Methyläthersalizylsäure zum Grundfutter wird die abgespaltene Salizylsäure vom Organismus zum grössten Teil in gebundener Form abgeschieden.